

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE EINWIRKUNG  
DES OZONS AUF DAS BLUT UND EINIGE  
ORGANE DER REGENBOGENFORELLE

BERND OLLENSCHLÄGER

---

1972

---





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41553803\\_0062](https://archive.org/details/IA41553803_0062)



Aus dem Zoologisch-Parasitologischen Institut  
der Tierärztlichen Fakultät der  
Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr.h.c. H. L i e b m a n n

Untersuchungen über die Einwirkung des Ozons auf das  
Blut und einige Organe der Regenbogenforelle

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n  
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München



von  
B e r n d O l l e n s c h l ä g e r  
aus  
Schwerin

München 1973

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Universität München

Dekan: Professor Dr. J. B o e s s n e c k  
Referenten: Prof.Dr.Dr.h.c.H. L i e b m a n n  
Prof.Dr.H. R e i c h e n b a c h - K l i n k e  
Korreferent: Professor Dr. H. K r a f t

Tag der Promotion: 11. Februar 1972



## INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                | Seite |
|----------------------------------------------------------------|-------|
| A. Einleitung                                                  | 1     |
| B. Literaturübersicht                                          | 4     |
| I. Das Ozon                                                    | 4     |
| 1. Definition und Darstellung von Ozon                         | 4     |
| 2. Ozonide                                                     | 6     |
| 3. Anwendungsbereich von Ozon                                  | 6     |
| II. Ozonisierung von Wasser                                    | 10    |
| 1. Ozonaufnahme- und zerfall in verschiedenen Wasserqualitäten | 10    |
| 2. Temperaturabhängigkeit                                      | 13    |
| 3. Nachweis von Ozon im Wasser                                 | 13    |
| III. Die Wirkung des Ozons auf Organismen                      | 15    |
| 1. Menschen und Säugetiere                                     | 15    |
| 2. Bakterien und Pilze                                         | 18    |
| 3. Fische                                                      | 19    |
| C. Eigene Untersuchungen                                       | 22    |
| I. Material und Methodik                                       | 22    |
| 1. Materialbeschaffung                                         | 22    |
| 2. Versuchsanordnung                                           | 22    |
| 3. Untersuchungsmethoden                                       | 28    |
| a) Wasseruntersuchungen                                        | 28    |
| b) Blutuntersuchungen                                          | 33    |
| c) Histologische Untersuchungen                                | 39    |
| II. Ergebnisse                                                 | 39    |
| 1. Das klinische Verhalten der Fische unter Ozoneinfluß        | 39    |

|                                                                               | Seite |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 2. Das normale Blutbild von Forellen                                          | 45    |
| a) Die korpuskulären Bestandteile                                             | 45    |
| b) Der Hämatokrit                                                             | 47    |
| c) Das Hämoglobin                                                             | 48    |
| d) Der Blutzucker                                                             | 49    |
| e) Das Gesamteiweiß und die Elektrophorese                                    | 52    |
| 3. Das Blutbild nach Ozoneinfluß                                              |       |
| a) Die korpuskulären Bestandteile                                             | 55    |
| b) Der Hämatokrit                                                             | 61    |
| c) Das Hämoglobin                                                             | 65    |
| d) Der Blutzucker                                                             | 69    |
| e) Das Gesamteiweiß                                                           | 73    |
| f) Die Elektrophorese                                                         | 78    |
| D. Pathologisch-histologische Untersuchung einzelner Organe                   | 86    |
| I. Kiemen                                                                     | 86    |
| 1. Anatomie der Kiemen                                                        | 86    |
| 2. Histologische Kiemenuntersuchungen an Versuchs- und Kontrollfischen        | 88    |
| II. Haut                                                                      | 95    |
| 1. Anatomie der Haut                                                          | 95    |
| 2. Histologische Hautuntersuchungen an Versuchs- und Kontrollfischen          | 96    |
| III. Leber                                                                    | 101   |
| 1. Anatomie der Leber                                                         | 101   |
| 2. Histologische Leberuntersuchungen an Versuchs- und Kontrollfischen         | 102   |
| E. Die Ozoneinwirkung auf die Eier und geschlüpfte Brut der Regenbogenforelle | 105   |
| F. Besprechung der Ergebnisse                                                 | 112   |
| G. Zusammenfassung                                                            | 124   |
| Summary                                                                       | 127   |
| H. Literaturverzeichnis                                                       | 130   |
| Lebenslauf                                                                    | 139   |

## A. Einleitung

Ozon wird in zunehmendem Maße in vielen Lebensbereichen eingesetzt. Ob es sich dabei nun um eine bessere Trinkwasseraufbereitung, die Reinigung von Industrieabgasen oder um die Desinfektion von Luft handelt; überall kann das Ozon bei richtiger Anwendung ein gutes Mittel sein, um auf andere Chemikalien zu verzichten, die meistens schlecht abbaubar sind und viele Nebenwirkungen besitzen.

Ozon ( $O_3$ ), das stärkste bekannte Oxydationsmittel, hat neben diesen positiven Einsatzmöglichkeiten leider auch eine starke toxische Wirkung auf Mensch und Tier. Menschen, die z.B. die Trinkwasserozonisierung in Wasserwerken durchführen, die Klimaanlage bedienen oder als Schweißer tätig sind, können bei unsachgemäßer Arbeit toxische Ozonkonzentrationen erhalten. Während normalerweise der Ozonanteil der Luftatmosphäre 0,005 mg/l Luft beträgt, besitzt die Luft von Los Angeles einen Ozongehalt von etwa 0,6 mg/l Luft (Los Angeles Smog). Dieser Ozongehalt der Luft ist für den Menschen nicht ungefährlich. Der Los Angeles Smog entsteht durch die photochemische Oxydation organischer Substanzen, die meistens von den Autoabgasen herrühren. Welche Bedeutung hat nun Ozon für die Fische und für die Fischzuchtanstalten? Bei den Aquarianern erfreut sich die Wasseraufbereitung durch Ozon schon seit Jahren großer Beliebtheit. Die guten Erfolge, die hier im Hinblick auf die Wasseraufbereitung (direkte Oxydation von biologischen Abfallstoffen zu Ammoniak) und in der Verhinderung von Krankheitsausbrüchen erreicht worden sind,

sprechen für sich. Eine falsche Ozonanwendung führte aber immer zu schweren Schädigungen der Fische.

In den Fischzuchtanstalten hat man den Einsatz von Ozon bisher auf die Reinigung des Wassers beschränkt. Neue Einsatzmöglichkeiten für Ozon liegen in den Kreislaufsystemen für die Fischzucht und -mast. Der Einsatz von Ozon gegen den Saprolegniabefall von Forelleneiern ist in einigen Fällen schon ausprobiert worden. Dabei kann auf die Verwendung von Chemikalien wie z.B. Peranganat und Malachitgrün mit ihren bekannten Nebenwirkungen verzichtet werden. In letzter Zeit spielen die Beobachtungen über die Förderung der Geschlechtsreife bei Forellen, Gewichtszunahme unter Ozoneinfluß, die Ausrichtung der Lachswanderungen nach Ozongeruch und die beobachtete gute Heilungstendenz von verletzten Forellen durch ozonisiertes Wasser in der Literatur keine unwichtige Rolle.

Aus den oben geschilderten Verhältnissen ist zu ersehen, daß damit gerechnet werden kann, daß das Ozon auch in der Aufzucht und Mast von Fischen eine immer größere Verbreitung finden wird. Das erfordert aber eine genaue Kenntnis des toxischen Wirkungsmechanismus des Ozons auf die Fische, da durch Unachtsamkeit und Fehler in der Ozonisierungsanlage große Fischsterben ausgelöst werden können. Während bei Menschen und Säugetieren der toxische Einfluß des Ozons auf die verschiedenen Organe genau untersucht worden ist, liegen ähnliche Arbeiten über Fische in nur geringem Umfange vor (HUBBS, 1930; BENOIT und MATLIN, 1966). Blut- und histologische Untersuchungen fanden überhaupt nicht statt.

So war es meine Aufgabe, den Einfluß von Ozon auf das Blut, die wichtigsten Organe, die befruchteten Eier und die geschlüpfte Brut von Regenbogenforellen zu untersuchen.

An dieser Stelle erlaube ich mir, Herrn Professor Dr.Dr.h.c.H.LIEBMANN und Herrn Professor Dr.H.-H. REICHENBACH-KLINKE für die Überlassung des interessanten Themas, die wertvolle Unterstützung der Arbeit und den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz im Zoologisch-Parasitologischen Institut meinen aufrichtigen Dank auszusprechen.

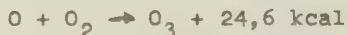
Danken möchte ich auch den Damen und Herren des Zoologisch-Parasitologischen Institutes sowie Herrn Oberkonservator Dr.BOHL und Herrn Chemiedirektor Dr.REIMANN von der Bayerischen Biologischen Versuchsanstalt, die mir bei vielen Problemen wertvolle Hilfe geleistet haben.

## B. Literaturübersicht

### I. Das Ozon

#### 1. Definition und Darstellung von Ozon

Ozon entsteht durch Einwirkung von Sauerstoffatomen auf Sauerstoffmoleküle, ausgedrückt durch die Formel:



Strukturformel:  $\begin{array}{c} O - O \\ | \\ O \end{array}$

Zur Darstellung von Sauerstoffatomen aus Sauerstoff wird Energie benötigt, die je Grammatom Sauerstoff 59,1 kcal beträgt. Insgesamt ergibt sich also eine negative Bildungswärme von 34,5 kcal.

Hergestellt wird Ozon üblicherweise durch stille elektrische Entladungen mit Hilfe von hochgespanntem Wechselstrom (Siemens'scher Ozonisator). Diese elektrischen Entladungen wirken im Ozonisator auf Sauerstoffgas ein und verwandeln dieses zum Teil in Ozon. Bei der technischen Herstellung erzielt man höchstens 15% Ozon neben 85% gewöhnlichem Sauerstoff.

Ozon entsteht auch bei vielen chemischen und physikalischen Vorgängen (z.B. Einwirkung von UV-Strahlen auf Luftsauerstoff, radioaktive Strahlung).

Chemisch reines Ozon ist eine violettblaue Flüssigkeit. Die Dichte des gasförmigen Ozons beträgt 1,65 (Luft = 1 gesetzt). Charakteristisch ist der

Geruch des Ozons, der noch in einer Verdünnung von 1:500.000 zu bemerken ist. Die Wasserlöslichkeit ist gering, denn in 1 Liter Wasser löst sich nur 0,98 g Ozon.

Als endotherme Verbindung zerfällt Ozon schon bei gewöhnlichen Temperaturen sehr schnell.



Ozon ist das stärkste Oxydationsmittel, das wir kennen. Durch die relative Labilität der energiereichen Ozonmoleküle zerfällt das Ozonmolekül in ein Sauerstoffmolekül und ein sehr reaktionsfreudiges Sauerstoffatom.



Hierdurch wird das Ozon zu einem der wirksamsten Oxydationsmittel der Chemie. So werden fast alle Metalle zu den höchsten Metalloxyden oxydiert, Sulfide zu Sulfaten, Ammoniak zu Salpetersäure, Jodkaliumlösung zu Jod.

Auch organische Stoffe werden von Ozon stark oxydiert. So werden Bakterien abgetötet und das Einatmen größerer Ozonmengen verursacht eine Reizung der Atemwege, Atembeschwerden, Nasenbluten und Kopfschmerzen bei Menschen.

Eine Illusion ist die ozonreiche Waldluft der Kurorte, da hier nur etwa einige Milligramm Ozon auf 50.000 l Luft kommen, so daß man nicht von einem Einfluß auf die Atmungstätigkeit sprechen kann. Nach einem Gewitter ist der Ozongehalt der

Luft leicht erhöht. Das Vorhandensein einer Ozonschicht in der Stratosphäre bewirkt eine Schwächung der auf die Erde einfallenden UV-Strahlen.

## 2. Ozonide

Organische Verbindungen mit einer Doppelbindung addieren leicht Ozon unter Bildung von Ozoniden. Diese Tatsache ist deshalb von großer Bedeutung, da die Ozonide wie das Ozon eine starke Oxydationswirkung haben. Die Ozonide sind oft polymer und fallen dann als Gele oder pulverige Substanzen an.

In wässriger Lösung scheint der Reaktionsverlauf zwischen Ozon und organischen Stoffen komplizierter zu sein. Es reagiert zuerst das ganze Gasmolekül mit den organischen Stoffen und so entstehen Ozonide, die sehr schnell hydrolisieren. Man nimmt an, daß bei größeren Ozonmengen ein Abbau zu Kohlendioxyd und Wasser erfolgt (HOLLEMANN-WIBERG, 1960).

## 3. Anwendungsbereich von Ozon

Ozon wird schon seit vielen Jahren erfolgreich in der Trinkwasseraufbereitung eingesetzt. So wurde 1891 in Berlin die erste Wasserentkeimung mit Ozon durchgeführt. Keime und lästige Geruchs-, Geschmacks-, Färbungs- und Trübungsstoffe im Trink- und Badewasser werden durch Ozon beseitigt. Gegenüber Chlor hat es den Vorteil der höheren Oxydationskraft und besitzt keine geruchliche und geschmackliche Beeinträchtigung des Trinkwassers. Ozon baut sowohl

organische als auch anorganische Stoffe im Wasser ab. In der Wasserwerkspraxis benutzt man für die Entkeimung nur 0,1 bis 1 mg/l Ozon und bis zu 3 mg/l Ozon zur Beseitigung organischer Belastungsstoffe bei einer Einwirkungsdauer von etwa 45 min.

Großtechnische Ozonanlagen befinden sich z.B. in den Wasserwerken von Paris, Kiew, Düsseldorf und Salzburg, im Olympiabad in Helsinki und im Zentralbad von Stockholm.

In letzter Zeit wird Ozon in zunehmendem Maße in der Aquaristik benutzt. Besonders im Salzwasseraquarium hat es sich gut eingeführt. Da die Fische mit dem Ozonwasser keinen direkten Kontakt haben dürfen, wird das Wasser im Filter mit Ozon versetzt und muß auf dem Wege ins Becken einen Kohlefilter passieren, damit alles überschüssige Ozon abgebaut wird.

Bei dem Abbau von Ozon im Kohlefilter entstehen kleine Mengen  $\text{CO}_2$  und  $\text{CO}$ , die aber durch starke Belüftung des zurückströmenden Wassers beseitigt werden können. Da das Ozon die organischen Stoffe nicht weiter als zu Ammoniak oxydieren kann, muß das Wasser anschließend über einen Sandfilter geleitet werden, damit hier die bakterielle Oxydation des Ammoniaks über Nitrit zu Nitrat erfolgen kann.

Organische Stoffe  $\xrightarrow{\text{O}_3}$  Ammoniak  $\xrightarrow{\text{Bakterien} + \text{O}_2}$   
Nitrit  $\xrightarrow{\text{O}_3}$  Nitrat (FRANK DE GRAF, 1970)

Organische Stoffe im Wasser können ohne Zutun von Bakterien direkt zu Ammoniak oxydiert werden. Die Schwierigkeiten und Gefahren eines bakteriellen Abbaus können durch Ozon also verringert werden. Eine zu hohe Konzentration von Ozon würde aber die notwendigen Nitritbakterien abtöten, so daß es zu einer starken Anreicherung von Ammoniak kommen würde mit ihren schädlichen Folgen für die Fische.

Werden Medizinalfutter oder andere Arzneimittel dem Aquariumwasser zugesetzt, muß die Ozonisierung des Wassers unterbrochen werden, da sonst die Arzneimittel nicht zur Wirkung kommen können und durch unkontrollierbare chemische Veränderungen der Stoffe die Fische gefährdet werden können. An unlösliche Sulfide gebundene Metallionen können durch Ozon wieder frei gemacht werden und in Lösung gehen. Nach einer Behandlung des Aquariums mit Kupfersulfat sind nach der Kur im Becken und im Filter Kupfer- und Zinksulfide anwesend, die durch Ozonisierung frei werden und giftige Konzentrationen erreichen können.

Die Ozonlüftung ist ein weiterer Anwendungsbereich. Dabei wird Ozon in genügend hoher Konzentration der künstlichen Lüftung zugeführt, wodurch infektiöse Keime, z.B. auf frischgeschlachtetem Fleisch, abgetötet werden. Diese Art der Ozonlüftung findet man in einigen Kühlhallen auf Schlachthöfen.

Zum Bleichen von Wäsche, Zellstoff, Ölen, Fetten usw. benutzt man ebenfalls Ozon.

In der Chemie wird Ozon verwendet, um Stoffe zu reinigen oder deren Struktur zu erkunden.

Die Anwendung des Ozons in der Fischzucht hat bisher keine große Bedeutung erlangt. Als erstes wäre hier die Reinigung und Desinfektion des Beckenwassers zu nennen. Die Betriebskosten werden durch die nur notwendigen kleinen Anlagen gering gehalten und man ist in der Lage, durch das ozonisierte Wasser viele Krankheiten von den Fischen fernzuhalten. Chemikalien, wie z.B. Permanganat und Malachitgrün, finden keinen Einsatz, die ja bekanntermaßen ihre Nebenwirkung haben. Für die Zukunft könnten folgende Beobachtungen in der Fischzucht große Bedeutung erhalten: So berichteten LESAGE und HAYE (1964), daß kleine Überschwemmungen nach einem Gewitterregen dazu geführt haben, daß Lachse und Forellen plötzlich Wehre übersprangen, was durch provozierte Überschwemmungen nicht erreichbar war. Sie nahmen an, daß das im Gewitterregen vorhandene Ozon die Fische soweit stimuliert hat, daß sie fähig waren, die Hindernisse zu überspringen.

GUYARD (1968) stellte vor 15 Jahren fest, daß Gewitterregen die Geschlechtsreife der in einer Fischzucht aufgezogenen weiblichen Forellen beschleunigte. BOUCHARD (1968) beobachtete diese Erscheinung bei weiblichen Hechten. Beide führen diese Veränderung auf Ozoneinfluß zurück. LAMARQUE (1968) spricht dem Ozon eine führende Rolle bei der Lachswanderung zu. Forellen, die vorsätzlich

verletzt und anschließend in einem mit Ozon behandelten Wasser gehalten wurden, waren nach 17 Tagen geheilt, während die verletzten Fische, die im ozonfreien Wasser gehalten wurden, nach dieser Zeit tot waren.

## II. Ozonisierung von Wasser

### 1. Ozonaufnahme und -zerfall in verschiedenen Wasserqualitäten

Die Ozonisierung von Wasser ist mit einigen Schwierigkeiten verbunden. So zerfällt Ozon in wässriger Lösung erheblich schneller als im Gaszustand. Bei dem Zerfall des Ozons in wässriger Lösung entstehen viele Zwischenprodukte, die ebenfalls labil und von oxydierender Wirkung sind; z.B.  $\text{HO}_3$ ,  $\text{HO}_2$ ,  $\text{HO}$ ,  $\text{O}_2$  (STUMM, 1956).

Die Geschwindigkeit des Ozonzerfalls im Wasser ist pH-abhängig, und zwar beschleunigter Zerfall mit steigenden pH-Werten. Die Ozonlöslichkeit ist bis zu dem pH-Wert von 8,5 pH-unabhängig. Bei höheren pH-Werten sinkt die Löslichkeit.

Katalysiert wird dieser Zerfall durch Metalle und zahlreiche organische Substanzen (Fermente, Zucker usw.).

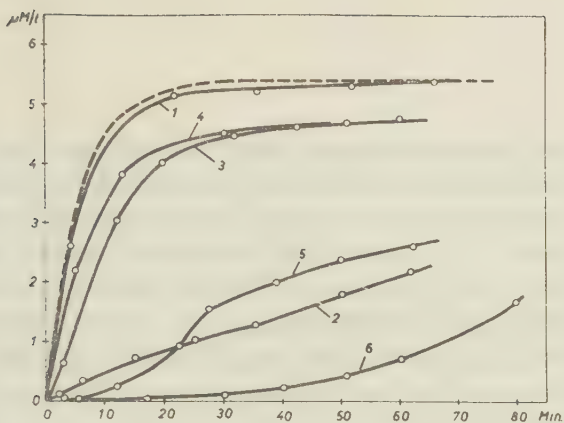


Abb.1 Ozonaufnahme verschiedener Wässer (nach SULZER, 1958)  
 --- Theoretische Aufnahmekurve  
 1. bidestilliertes Wasser  
 2. einfach destilliertes Wasser  
 3. Leitungswasser; 4. Grundwasser  
 5. Zürichsee-Wasser (filtriert); 6. Bodenseewasser

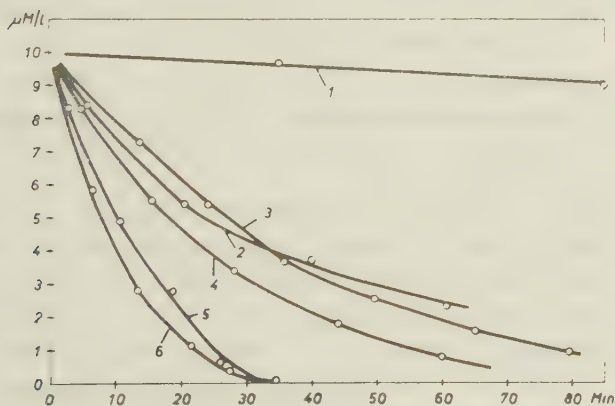


Abb.2 Ozonzerfall in verschiedenen Wässern (nach SULZER, 1958)  
 1. bidestilliertes Wasser  
 2. einfach destilliertes Wasser  
 3. Leitungswasser; 4. Grundwasser  
 5. Zürichsee-Wasser (filtriert); 6. Bodenseewasser

Die wässerigen Ozonlösungen enthalten also neben dem molekularen Ozon noch eine Reihe anderer oxydierender Substanzen. Radikalartige Zerfallsprodukte und die schon erwähnten Ozonide besitzen also ebenfalls bakterizide Eigenschaften (WUHRMANN und MEYRATH, 1955). Verschiedene Wasserarten besitzen auch eine unterschiedliche Ozonaufnahme und -abnahme.

Die von SULZER (1958) durchgeführten Untersuchungen sind in der Abbildung 1 wiedergegeben. Es wurden, wie die Abbildung zeigt, drei verschiedene Wassertypen unterschieden:

- a) Wasser, das rasch den Sättigungswert erreicht (bidestilliertes Wasser);
- b) Wasser, das nach einer gewissen Zeitspanne den Sättigungswert erreicht (Grundwasser);
- c) Wasser, das auch nach längerer Ozonisierung keinen Sättigungswert erreicht (Oberflächenwasser).

Die Untersuchungsergebnisse zeigen, daß für bidestilliertes Wasser die Ozonaufnahme und -sättigung sehr schnell erfolgt. Die Löslichkeit und der Zerfall des Ozons hängt von den im Wasser gelösten Stoffen, z.B. Härtebildner, (siehe Abb.2) ab. STUMM (1956) konnte durch seine Versuche beweisen, daß sowohl die Ozonaufnahme als auch der Zerfall von der Art des Wassers, dem pH-Wert und auch der Temperatur abhängt.

Äußere Bedingungen, wie Gefäßart und -größe, Wasserbewegungen usw., beeinflussen den Zerfall ebenfalls stark.

## 2. Temperaturabhängigkeit

Die Temperatur des Wassers scheint mit entscheidend zu sein für seine Ozonaufnahme. So konnte SULZER (1958) durch Versuche mit bidestilliertem Wasser bei verschiedenen Temperaturen eine unterschiedliche Ozonaufnahme nachweisen.

| Versuche bei verschiedenen Temperaturen<br>(nach SULZER, 1958) | Ozonkonzentration<br>in $\mu\text{M}/\text{l}$ |      |
|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|------|
| Bidestilliertes Wasser                                         | 5,0° C                                         | 22,3 |
| Bidestilliertes Wasser                                         | 20,0° C                                        | 14,8 |
| Bidestilliertes Wasser                                         | 30,0° C                                        | 9,25 |

---

|                        |         |      |
|------------------------|---------|------|
| Bidestilliertes Wasser | 5,0° C  | 22,3 |
| Bidestilliertes Wasser | 20,0° C | 14,8 |
| Bidestilliertes Wasser | 30,0° C | 9,25 |

---

Löslichkeitskoeffizient für Ozon in Wasser bei  $u = 5 \cdot 10^{-2}$   
(nach STUMM, 1956)

---

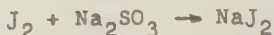
|                                   |      |      |      |       |      |      |      |      |
|-----------------------------------|------|------|------|-------|------|------|------|------|
| Temperatur<br>°C                  | 5    | 8    | 10   | 13    | 15   | 17   | 20   | 25   |
| Löslich-<br>keits-<br>koeffizient | 0,43 | 0,41 | 0,39 | 0,375 | 0,35 | 0,33 | 0,32 | 0,28 |

---

## 3. Nachweis von Ozon im Wasser

Zum Nachweis von Ozon im Wasser sind verschiedene Verfahren entwickelt worden. Die wichtigsten Methoden sollen hier kurz erwähnt werden.

Die titrimetrische Bestimmung von Ozon (Jodometrie)



1 ccm verbrauchter 1/100-Na-Thiosulfatlösung entspricht 0,24 mg/l  $\text{O}_3$ . Die jodometrische Ozonbestimmung ist in nichtalkalischem und ozonzehrungsfreiem Wasser ziemlich genau.

Mangan-o-Toluidin-Methode (ZEHENDER und STUMM, 1953)

Durch Ozon wird zweiwertiges Mangan in saurer Lösung zu  $\text{MnO}_2$  oxydiert.  $\text{MnO}_2$  reagiert danach mit o-Toluidin, so daß die Ozonkonzentration photometrisch ermittelt werden kann.

Einfache o-Toluidin-Methode (HETTICHE, 1953)

Es ist eine kolorimetrische Bestimmung der durch Ozon bewirkten Gelbfärbung von o-Toluidin-Lösung.

Oxydative Entfärbung von Indigosulfonat  
(DORTA-SCHAEPPi und TREADWELL, 1949)

Direkte, spektrophotometrische Verfahren

Ozonlösungen haben eine typische, breite Absorptionsbande mit einem Maximum bei 260 m $\mu$

Photometrische Verfahren unter Verwendung von  
Diacetyldihydrolutidin (NASH, 1964)

Photometrischer Nachweis durch blaugefärbten  
Perjodatokupfer-(III)-Komplex

(D.M.WAGNEROVA, K.ECKSCHLÄGER und I.VEPREK-SISKA,  
1964)

### III. Die Wirkung des Ozons auf Organismen

#### 1. Menschen und Säugetiere

Eine Schädigung des menschlichen oder tierischen Organismus durch erhöhte Ozonkonzentration tritt normalerweise sehr selten auf. Menschen, die z.B. die Trinkwasserozonisierung in Wasserwerken durchführen, Klimaanlage bedienen oder als Schweißer tätig sind, können bei unsachgemäßer Bedienung der Geräte zu hohe Dosierungen erhalten. Der Ozonanteil der Luftatmosphäre beträgt auf der Erde etwa 0,005 mg/l. STOKINGER und Mitarbeiter (1957) konnten mit der zwei- bis dreifachen Dosis der in Städten angetroffenen Ozonkonzentration eine chronische Bronchitis und Bronchiolitis mit konsekutivem Lungenemphysem hervorrufen. Die Luft in Los Angeles besitzt einen Ozongehalt von etwa 0,6 mg/l Luft.

Durch Menschen- und Tierversuche konnte gezeigt werden, daß die Konzentration von 1-2 mg Ozon/l Luft nach 1 bis 2 Stunden Einatmen eine starke Reizung der Schleimhäute und zentralnervöse Störungen über einige Stunden verursacht. Die mittlere tödliche Dosis ( $LD_{50}$ ) für Ratten und Mäuse liegt bei 2-8 mg Ozon/l Luft. Nach STOKINGER (1957) können ansonsten harmlose Ozonkonzentrationen toxisch wirken, wenn der Mensch bzw. das Tier sich körperlich betätigt. Bei in starker Bewegung befindlichen Ratten und Mäusen wirkt 1 mg/l Luft nach 6 Stunden Einatmung tödlich. STOKINGER (1965) konnte tierexperimentell zeigen, daß die Inhalation von  $O_3$  zum Auftreten von Antikörpern (Präzipitintest) führt,

was auf seiner Eiweiß-denaturierenden Eigenschaft beruhen dürfte. Die Möglichkeit einer echten Sensibilisierung kann zum Teil auch vorliegen.

SACHSENMAIER (1960) untersuchte die Wirkung von Ozon auf Proteine, Nucleinsäuren, deren Bausteine und auf lebende Zellen (Tumorzellen) und stellte dabei fest, daß eine primäre Schädigung der Zellmembranen stattfindet und Nucleinsäuren und Proteine depolymerisiert werden. FREEBAIRN (1957) stellte Untersuchungen über den Mechanismus der Atmungs-  
hemmung durch Ozon an. Durch 1-2 u Mol  $O_3/cm^3$  wurde die Citrat-Veratmung durch die Mitochondrien aus Kohl-, Spinat- und Kuhleberzellen stark gehemmt, die nur teilweise durch Ascorbinsäure regeneriert werden konnte. CUSHUY (1924) kam bei seinen Versuchen zu dem Ergebnis, daß Ozon von lebender Materie schnell abgebaut wird und nicht unverändert im Blut absorbiert wird. Als Todesursache für seine Versuchstiere nimmt er die lokalen Reizungen und das Absinken des ausgeschiedenen  $CO_2$  an. CARLSON und JORDAN (1913) erklären sich den Effekt von  $O_3$  durch eine Veränderung der respiratorischen Membranen und durch eine Stimulation der Nervenendigungen, ohne daß Veränderungen des Blutfarbstoffes und Asphyxie festzustellen sind. JONES, JENKINS, COON und SIEGEL (1970) setzten Ratten, Meerschweinchen, Hunde, und Affen jeweils über 90 Tage einer Ozonkonzentration von 0,26, 0,68, 2,4 und 3,0 mg  $O_3/m^3$  aus und untersuchten anschließend die Leukozytenanzahl, Hämoglobingehalt, den Hämatokrit, die Enzyme und die pathologischen Veränderungen.

Die geringen Veränderungen des Hämoglobins und des Hämatokrits erklären sich die Autoren durch die allgemeine Kombination von Sekundäreffekten, z.B. hervorgerufen durch Veränderungen des Körpergewichts, und schlechte physische Kondition. MITTLER (1957) stellte mit Ratten Ozonversuche an und konnte keine deutlichen Unterschiede im Hämoglobin- und Hämatokritvolumen feststellen. MAC EWEN und GECKLER (1968) konnten zwischen Kontrolltieren und Versuchstieren, die einem Ozonstrom von  $0,19 \text{ mg/m}^3$  Luft für 90 Tage ausgesetzt wurden, ebenfalls keine Veränderung der Blutwerte nachweisen. SCHALM (1961) stellte die stärksten Veränderungen des Hämoglobingehalts und des Hämatokrits bei überlebenden Meerschweinchen fest, die mit  $2,4 \text{ mg Ozon/m}^3$  Luft behandelt wurden. Er nimmt ebenfalls eine sekundäre Hämoglobin-Konzentrationsveränderung an, deren Ursache wohl die Veränderung im Wassergleichgewicht ist. Die Mehrzahl der vorhandenen pathologischen Veränderungen betreffen die Lunge, obwohl STOKINGER (1965) darauf hinwies, daß Ozon, wie andere toxische Stoffe, nicht nur ein "Zielorgan" angreift. Aus der Sicht von STOKINGERS Beobachtungen, daß nämlich die ödematöse Antwort und die begleitenden Lungenphänomene deutlich reduziert sind, wenn eine Unterbrechung der Ozoninhalation vorgenommen wird, könnte man schließen, daß stärkere Lungenveränderungen bei Tieren nur dann auftreten, wenn sie einem kontinuierlichen Ozoneinfluß ausgesetzt sind. Histopathologische Untersuchungen zeigen eine Erhöhung der Anzahl und der Stärke von entzündlichen Prozessen, Ödeme, Hämorrhagien in der Lunge, die parallel laufen mit der Höhe der Ozonkonzentration, nämlich zwischen  $0,26$  und  $3,0 \text{ mg Ozon/m}^3$ .

## 2. Bakterien und Pilze

Zur Wirkung von Ozon auf Organismen des Bodensediments hat MUNCHMANN (1954) berichtet. Er stellt fest, daß sehr widerstandsfähige Spezies von Bakterien die 40-Grunden-Einwirkung von Ozon überleben. Überlebend sind auch die meisten Pilze (100 Spezies/10 mg/l O<sub>3</sub> bei 11 bis 12 mg/l O<sub>3</sub> notwendig waren, durch 0,15 mg/l O<sub>3</sub> nach 14 min. nach Einwirkung des Ozons getötet werden). Abbildung 1 zeigt den statistisch ermittelten Sterbungsverlauf der Erdbakterien bei der Applikation von Ozon, das die Lebenswirkung des Ozons nach einer bestimmten Zeit beginnt, und schließlich zum stabil verbleibenden Ozongehalt in Wasser erreicht worden ist. In diesem Fall liegt der Beginn der Lebenswirkung bei 10 mg/l MUNCHMANN liefert seine Versuche auf pflanzliche und tierische Mikroorganismen (Plankton) aus.

5 bis 6 min. Ozonisierung bzw. 0,3-0,5 mg/l Ozon genügt, um Farnen der Viskositätsklasse, Nixie und Flaktonen, sowie auch Mikroorganismen, Würmer (Tubifex, 10 Stück pro Liter = 0,5 mg/l) und Verrucaria (10 Stück/l, 0,6 mg/l) zu töten nach 10 min. Ozoneinwirkung getötet.

Die Lebenswirkung scheint mit bestimmtem Ozongehalt im Wasser abzuweichen zu sein, was aber nicht ohne bestimmten Zeitintervall, die Wahl der Mikroorganismen, der Temperatur, des Ozongehalts und schließlich auch der Ozonwasser-Löslichkeit abhängt.

Vergleicht man die Widerstandsfähigkeit der Pilze und Bakterien gegenüber Ozon, so stellt man eine höhere Resistenz der Pilze fest.

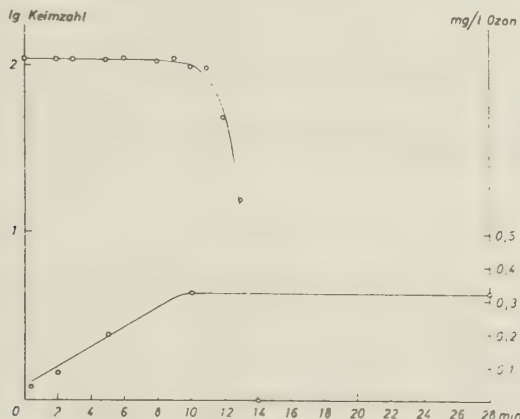


Abb.3 Anzahl der getöteten Keime in Abhängigkeit von der Dauer der Ozoneinwirkung

### 3. Fische

HUBBS (1930) untersuchte die Toxizität des Sauerstoffs auf verschiedene Fischarten. Er gewann den  $O^+$  aus Ozon,  $HClO_2$  und  $H_2O_2$ . Dabei konnte er feststellen, daß die auftretenden Symptome bei den verschiedenen Fischarten ziemlich konstant in ihrer Art wie in ihren Folgen sind. Nach dem Einsetzen des Ozonstromes zeigte sich bei den Fischer ein nervöses Umherschwimmen, der Boden wurde gemieden, zuckende und ruckartige Bewegungen und spastisches Kopfschütteln ausgeführt. Die Atem-

frequenz und ihre Tiefe waren erhöht. Der Fisch erschien aber nicht, wie bei Asphyxie, an der Wasseroberfläche. HUBBS stellte fest, daß für eine subletale Konzentration von 0,01 ppm  $O^+$  charakteristische Unregelmäßigkeiten und Spasmen der Atembewegungen auftreten. Treten leichte Gleichgewichtsstörungen auf, so soll dies nach HUBBS das Ende der reversiblen Vergiftungserscheinungen anzeigen.

Erholung  $\longleftrightarrow$  \*  $\longrightarrow$  Tod (\* Gleichgewichts-  
a störungen)

Nach dem Auftreten der ersten Gleichgewichtsstörung soll es dem Fisch möglich sein, zeitweilig seine Balance wieder herzustellen. Es folgen dann die Stadien des Auf-der-Seite-Liegens, Sich-Wälzen- und-Schlagens, Umherschießens und der Ruhe. Im Endstadium liegt der Fisch bauchaufwärts, die Farbe verblaßt, starke Krämpfe und kaum wahrnehmbare Kiemenbewegungen sind charakteristisch. Die Haut an der Unterseite von Kopf und Brust soll ödematös werden.

HUBBS (1930) faßte seine Versuchsergebnisse folgendermaßen zusammen:

1. Elritzen werden getötet bei 0,03 ppm  $O^+$ .
2. Elritzen werden getötet bei 0,00002 Gewichtsanteilen  $O^+$ .
3.  $O^+$ -Effekt ist kumulativ.
4. Ab Stadium Gleichgewichtsstörungen irreversibel.
5. Resistenzunterschiede in einer Spezies.
6. Höhere Resistenzunterschiede als Elritzen:  
Micropterus  
Aplites

7. Angriffspunkt ist nicht das Blut.
8. Irritation bei Fischen: 0,01 ppm
9. Vergiftungssymptome sind nicht asphyktisch.
10. Symptome: Irritation, erhöhte und unregelmäßige Atmung, Gleichgewichtsverlust, wildes Wälzen und Umherschließen, Tetanusstarre, Tod.
11. Der Tod ist begleitet von ödematösen Schwellungen der Haut.
12. Die geringste Ozonkonzentration, die noch stabil ist, wirkt toxischer als die stabilste  $H_2O_2$ -Konzentration.

HUBBS ist der Meinung, daß Ozon eher über chemische Schädigung oberflächlicher Körperzellen als durch Wirkung auf die peripheren Nervenendigungen den Tod verursacht. DE GRAF (1970) und HÜCKSTEDT (1968) weisen auf die Gefahr für Aquarienfische hin, wenn ozonisierte Luft für Durchlüftungszwecke verwendet wird.

Zu hohe Ozonkonzentrationen wirken tödlich für Fische. Die Vernichtung von Hautparasiten der Fische durch Ozon wird abgelehnt, da mit der Abtötung der Parasiten eine starke Schädigung der Fische einhergeht. Die Parasiten sitzen tief im Hautschleim der Fische, so daß eine Abtötung der Parasiten nur über eine starke Hautschädigung der Fische erreichbar wäre.

DE GRAF (1970) weist auf die große Menge von Bakterien im Aquariumwasser hin. So vermehren sich im Aquariumwasser nicht nur die "nützlichen" Bakterien, sondern auch eine Anzahl von krankheitserregenden Bakterien für die Fische. Eine Desinfektion des durchlaufenden Wassers im Filter durch Ozon bringt gute Erfolge. Von BENOIT und MATLIN (1966) wurden von Saprolegnia befallene Eier mit Ozon behandelt.

## C. Eigene Untersuchungen

### I. Material und Methodik

#### 1. Materialbeschaffung

In der Zeit von November 1969 bis Frühjahr 1971 wurden mir von der Teichwirtschaftlichen Abteilung der Bayerischen Biologischen Versuchsanstalt in Wielenbach zweijährige Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) und Forelleneier im Augenpunktstadium für meine Versuche zur Verfügung gestellt. Die Forellen befanden sich in gutem gesundheitlichen Zustand, was auch später bei der Sektion der Vergleichsfische bestätigt wurde. Die Forellen wurden 14 Tage im Zoologisch-Parasitologischen Institut in Aquarien gehalten und gefüttert, damit die Fische sich weitgehend an die neue Umwelt akklimatisieren konnten, bevor sie in den Versuch genommen wurden. An Kontrollfischen wurden insgesamt 42 untersucht mit einem Durchschnittsgewicht von 306 g und einer Durchschnittslänge von 28,10 cm. Das Verhältnis von Rognern zu Milchnern betrug 22:20. Für die Versuche wurden 50 Regenbogenforellen eingesetzt, die ein Durchschnittsgewicht von 282,5 g und eine Durchschnittslänge von 28,30 cm besaßen. Die Geschlechterverteilung war 25:25. Die Regenbogenforelleneier waren alle befruchtet; die Embryonen lebten und befanden sich eine Woche vor dem Schlupf.

#### 2. Versuchsanordnung

Für die Ozonversuche benutzte ich ein Metallrahmen-glasaquarium von 50 l Fassungsvermögen (siehe Abb.4). Gefüllt wurde es mit Münchner Leitungswasser oder Grundwasser aus dem Institutsbrunnen.

Beide Wässer waren ohne Chlorbelastung. Das Aquarium war luftdicht mit einem Plexiglasdeckel zu verschließen. In dem Deckel befanden sich drei Öffnungen. Durch die eine Öffnung lief der Silikon-schlauch, der den Ozonisator mit dem auf dem Boden des Beckens liegenden Ausströmstein von 10 cm Länge verband. Dieser Stein produzierte feine Ozon-Luft-Gasbläschen, die einen innigen und langen Kontakt des Ozons mit dem Wasser gewähr-leisteten.

Um die Fische vor einem direkten Kontakt mit den aufsteigenden Ozon-Luftbläschen zu schützen, war der Ausströmstein durch ein stabiles Kunststoff-netz vom übrigen Aquarium abgegrenzt. Eine gute Durchmischung des ganzen Wassers mit Ozon war trotz des Netzes gewährleistet. Die zweite Öffnung leitete das an der Wasseroberfläche sich sammelnde und unter Druck stehende Ozonluftgemisch über Wasch-flaschen ab. In den beiden ersten Waschflaschen befand sich eine 0,1 n KJ-Lösung. Die letzte Wasch-flasche war mit einer 0,1 n Natriumthiosulfat-Lösung gefüllt, um übergetretene Jodteilchen zu binden. Mit dieser Vorrichtung war es möglich, die Differenz zwischen eingeleitetem Ozon-Luftgemisch und dem in den Waschflaschen gebundenen Ozonrest festzustellen. Darin besteht eine indirekte Mög-lichkeit, den Ozongehalt des Wassers zu berechnen. Die dritte Öffnung bestand aus einem 25 cm langen Kunststoffrohr, welches 20 cm in das Wasser hinein-reichte und an beiden Enden offen war. Durch dieses Rohr wurden die Wasserproben für die vorzunehmenden Messungen entnommen.

Zur eigentlichen Ozonisierungsanlage gehörten noch vier Geräte. Es handelte sich dabei um Zusatzgeräte, die für trockene und staubfreie Luft sorgen sollten. Mitentscheidend für die Ozonproduktion ist weiterhin die Messung der Luftfeuchtigkeit und die Menge der Luft, die durch den Ozonisator geschickt wird. Trockene und staubfreie Luft und die richtige Wahl des Luftdurchflußvolumens bringen die höchste Menge von Ozon. Die Steuerung der durch den Ozonisator geschickten Luftmenge ermöglicht es, Einfluß auf die Ozonproduktion zu nehmen. Um die Luft zu trocknen, schickte ich sie durch einen Kieselgelturm, an den sich ein Gaswollefilter anschloß, um die Staubteilchen festzuhalten. Die Verfärbung des Kieselgels von blau zu hellrosa zeigte die Wassersättigung des Trockenmittels an.

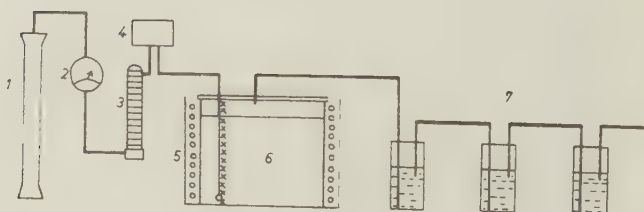


Abb. 4 Versuchsanlage  
1 Trockenturm; 2 Hygrometer; 3 Rota-  
Meßgerät; 4 Ozonisator; 5 Kühlmantel;  
6 Versuchsbecken; 7 Waschflaschen

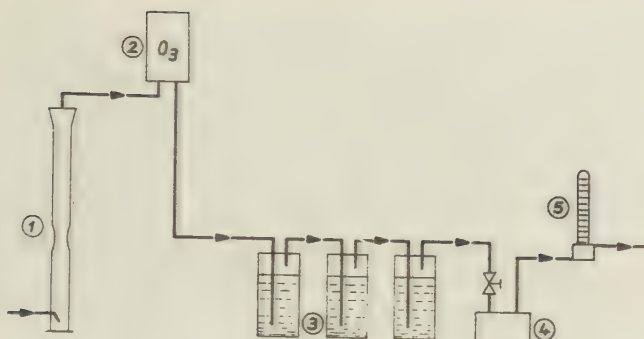


Abb.5 Anlage zur Leistungskontrolle  
eines Ozonisators  
1 Trockenturm; 2 Ozonisator; 3 Wasch-  
flaschen; 4 Saugpumpe; 5 Rota-Meßgerät

Ein zweiter Trockenturm gestattete mir eine schnelle Fortsetzung des Versuchs. Die Luftfeuchtigkeit wurde durch ein Hygrometer, der Luftdurchfluß mit einem Rota-Meßgerät festgestellt und dementsprechend reguliert. Die Luft für die Versuche entnahm ich einem Kompressor. Zu erwähnen wäre noch, daß alle benützten Schläuche aus Silikonmaterial waren, da sowohl einfache PVC-Schläuche, als auch Gummischläuche von Ozon angegriffen werden. Das Ozongerät wurde von der Firma Sander, Eltze, geliefert und war für 500 mg Ozon/h ausgezeichnet. Zwei Keramikelektroden, die mit dem Transformator und einem Regelwiderstand (10 bis 100%) verbunden waren, lieferten, wie aus untenstehender Leistungskurve zu entnehmen ist, maximal nur 265 mg Ozon/h. Diese Abweichung von der angegebenen Leistung führe ich

auf die Versuchsanordnung zurück. Es war mir nicht möglich, 100%ig trockene Luft herzustellen. Um die Ozonversuche bei gleicher Temperatur durchzuführen, bediente ich mich eines Kryomats TK 30 D der Firma Lauda, der die Wassertemperatur konstant auf  $8^{\circ}\text{C}$  hielt. Dazu mußte ich das eigentliche Versuchsaquarium in ein zweites, größeres Becken stellen, das mit Wasser gefüllt war und in dem dann die Kühlschlangen lagen. Der Kryomat arbeitete mit Methanol.

#### Leistungskurve des Ozonisators

Von der Firma wurde zwar eine Leistungskurve des Ozongerätes geliefert, sie war für meine Versuche aber unzureichend, da scheinbar zuviele unberechenbare Faktoren die Ozonproduktion beeinflussen. Unter den geschaffenen Versuchsbedingungen mußte ich mir deshalb meine eigenen Werte aufstellen. Dazu bediente ich mich einer Arbeitsvorschrift, wie sie von SCHMIDT (1966) beschrieben wurde. Aus der Abbildung 5 ist die Versuchsanordnung ersichtlich. Die getrocknete und gesäuberte Luft strömt durch den Ozonisator und kommt dann in die Frittenwaschflaschen, die mit 40 ml 10%iger KJ-Lösung gefüllt waren. Nur die dritte Waschflasche ist wieder mit einer 0,1 n Thiosulfatlösung gefüllt, um die übergetretenen Jodteilchen zu binden. Daran anschließend kommt die Pumpe, die Luft durch die Anlage saugt und schließlich in einem Rotameßgerät gemessen wird. Die Zeit wird mit der Stoppuhr festgehalten. Die Abbildung 6 zeigt die Leistungskurve des Ozonisators bei 100% und 50% Einstellung des Regelwiderstandes.

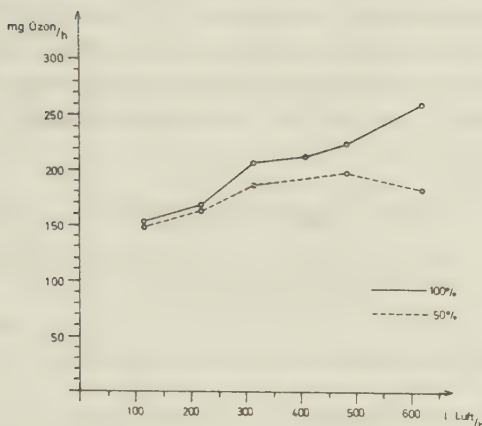


Abb.6 Die Leistungskurve eines Ozonisators bei einem Regelbereich von 100 bzw. 50 %

Da, wie schon erwähnt, verschiedene Faktoren bei den Versuchen berücksichtigt werden mußten, wurden folgende laufende Messungen durchgeführt.

### 3. Untersuchungsmethoden

#### a) Wasseruntersuchungen

Für die Ozonbestimmung wurde das jodometrische Verfahren gewählt. Die Genauigkeit dieses Verfahrens war für die Versuche ausreichend. Die Bestimmungen wurden nach der Vorschrift der "Deutschen Einheitsverfahren" durchgeführt. Mit einer 100 mm<sup>l</sup>-Pipette wurde das Ozonwasser aus dem Aquarium abgezogen und in 15 ml einer gepufferten Kaliumjodidlösung verbracht. (1 g KJ, 1,7 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> auf 100 ml). Nach

5 min. wurde mit frisch zubereiteter 0,01 n-Thiosulfatlösung titriert bis die Braunfärbung verschwand. Nach Ansäuerung mit 10 ml 25%iger Schwefelsäure gibt man 5 ml 1%ige Stärkelösung dazu und titriert bis zum Verschwinden der Blaufärbung.

Die Berechnung wurde folgendermaßen durchgeführt:

1 ml 0,01 n  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  entspricht 0,24 mg  $\text{O}_3$

#### Sauerstoffmessungen

Der Sauerstoffanteil im Wasser spielt eine wichtige Rolle für die Beurteilung von Fischversuchen, da sowohl Mangel als auch Überangebot an  $\text{O}_2$  die eigentlich vorzunehmenden Untersuchungen und deren Ergebnisse verfälschen können. So besteht ein Zusammenhang zwischen Wassertemperatur und gelöstem Sauerstoff. Es sind in 1 Liter Wasser bei

|       |                               |
|-------|-------------------------------|
| 0° C  | 14,56 mg $\text{O}_2$ gelöst  |
| 5° C  | 12,73 mg $\text{O}_2$ gelöst  |
| 10° C | 11,25 mg $\text{O}_2$ gelöst. |

Aus dieser Tabelle ist zu ersehen, daß der Sauerstoffsättigungsgrad des Wassers mit zunehmender Temperatur abnimmt.

Der Sauerstoffbedarf der einzelnen Fische ist sehr verschieden. So benötigen z.B. die salmonidenartigen Fische mehr Sauerstoff als die karpfenartigen. Nach SCHÄPERCLAUS (1954) sind für Forellen 5 bis 5,5 mg  $\text{O}_2$ /l schon kritisch, 4 mg  $\text{O}_2$ /l erzeugen

Atemnot, 3 mg  $O_2$ /l sind für längere Zeit nicht ausreichend und 1,5 bis 2 mg  $O_2$ /l sind in kurzer Zeit tödlich für Forellen. Sauerstoffmangel ist nicht nur häufig die Todesursache für Fische, sondern er fördert auch die Krankheitsanfälligkeit und erhöht die Giftwirkung von toxischen Stoffen. Für die Fischbrut bedeutet Sauerstoffmangel schlechte Entwicklung und damit größere Ausfälle. Zur Schädigung der Fische kann aber ebenso ein zu hohes Sauerstoffangebot führen. So berichtet HAEMPEL (1929) davon, daß eine erhöhte Sauerstoffspannung bei Salmoniden zu lebhafter Unruhe, gesteigerten Fluchtversuchen und zu erhöhter Atemfrequenz führen. Bei jungen Fischen sind Notatmung, Seiten- oder Rückenlage, Exophthalmus, Schleimabsonderungen und Gasblasen in den Blutkapillaren zu beobachten.

Unter der Haut des Maults, entlang der Seitenlinie und in den Flossen können Gasblasen auftreten, die zu den typischen Merkmalen der Gasblasenkrankheit gehören. Wird nämlich der Fisch mit dem unter höherem Druck stehenden sauerstoffgesättigten Gewebe in niedrigeren Druck verbracht, dann tritt dieser überschüssige Sauerstoff in Form kleiner Bläschen aus.

Durch die intensive  $O_3$ -Behandlung mit dem  $O_3$ -Luftgemisch erfordern die in diesem Absatz beschriebenen Schädigungen der Fische eine laufende Sauerstoffkontrolle des Versuchswassers. Die quantitative Bestimmung des Sauerstoffs wurde nach der Methode WINKLER durchgeführt.

Die Sauerstoffberechnung erfolgte nach der Formel:

$$\text{mg O}_2/\text{l} = \frac{\text{Verbrauch O,01 n Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 80}{\text{Flascheninhalt} - 2 \text{ cm}^3}$$

Bei den Kontrollversuchen, die ohne Ozonbelüftung durchgeführt wurden, wurde am Anfang des Versuches ein Sauerstoffgehalt des Wassers von 8,58 mg O<sub>2</sub>/l festgestellt. Am Ende dieses Kontrollversuches enthielt das Wasser 8,13 mg Sauerstoff/l Wasser. Es war also eine geringe Abnahme des Sauerstoffs zu verzeichnen. Bei den Ozonversuchen wurden folgende Werte festgestellt: Vor dem Versuch ein Sauerstoffgehalt des Wassers von 8,88 mg O<sub>2</sub>/l Wasser; nach dem Versuch ein Sauerstoffgehalt von 9,96 mg O<sub>2</sub>/l Wasser. Alle Sauerstoffmessungen wurden doppelt durchgeführt. Wie aus diesen Angaben zu entnehmen ist, ist bei den Kontrollversuchen am Ende eine Sauerstoffabnahme festzustellen, während bei den Ozonversuchen eine Sauerstoffzunahme des Wassers zu verzeichnen ist.

#### Temperaturmessungen

Es besteht ein Zusammenhang, in den entsprechenden Kapiteln beschrieben, zwischen Temperatur und Sauerstoffaufnahme und Temperatur und Ozonaufnahme. Zudem nimmt mit steigender Temperatur die Geschwindigkeit der Stoffwechselprozesse zu, die dann zu einer intensiveren Atmung führen mit einer stärkeren Ozonaufnahme und damit einer Erhöhung der Vergiftungsgefahr (RGT-Regel).

Die Wassertemperatur wurde bei allen Versuchen bei 8° C gehalten, einer Temperatur, die auch in den Hälterungsbecken vorlag.

### pH-Wert-Messungen

Ein pH-Wert, der unter 5,5 bzw. über 9,0 liegt, wird von den meisten Fischen nicht vertragen und es kommt durch die Reaktionen der Säure bzw. der Lauge mit dem Eiweiß zu Nekrosen an den Kiemenrändern und der Haut. Man bezeichnet diese Erscheinungen als Säure- bzw. Laugenkrankheit. Der pH-Wert des Versuchswassers bewegte sich zwischen 7,6 und 8,1, so daß Schädigungen durch den pH-Wert ausgeschlossen werden können. Für die pH-Messungen benutzte ich ein pH-Meter der Firma Beckman Instruments.

### Ammoniakmessungen

Da die Fische über einen längeren Zeitraum in einem verhältnismäßig kleinen Aquarium ohne Wasseraustausch gehalten wurden und damit eine Anreicherung von Stoffwechselprodukten vorlag, war damit zu rechnen, daß es zu einer Erhöhung des Ammoniakgehaltes im Wasser kommen würde. Dazu kam der Abbau von Eiweißkörpern durch Ozon. Dabei ist es wichtig, das Mengenverhältnis von  $\text{NH}_3$  und  $\text{NH}_4^+$  zu beachten, das von der Wasserstoffionenkonzentration abhängt. Im alkalischen Bereich entstehen mehr ungeladene  $\text{NH}_3$ -Moleküle, während im sauren Bereich nur geringe Anteile nachgewiesen werden können (pH-Wert des Versuchswassers zwischen 7 und 8,1). Die Giftigkeit

des Ammoniaks wird hauptsächlich dem freien  $\text{NH}_3$  zugeschrieben. WUHRMANN und WOKER (1949) stellten folgende Grenzkonzentrationen für Forellen fest:

|                     |                         |
|---------------------|-------------------------|
| Forellenbrut:       | 0,2 mg $\text{NH}_3$ /l |
| Regenbogenforellen: | 0,3 mg $\text{NH}_3$ /l |

Für die Bestimmung des Ammoniumions bediente ich mich der kolorimetrischen Methode mit NESZLERS Reagenz.

#### Wasserhärte (SBV)

Nach SCHÄPERCLAUS (1954) ist die Zusammensetzung des Wassers mit ausschlaggebend für den Grad der Giftwirkung. So stellte er fest, daß kalkarmes und Huminstoffe enthaltendes Wasser für viele Fische ungünstiger ist als kalkreiches, hartes Wasser. Die Ozonaufnahme des Wassers steht ebenfalls im Zusammenhang mit der Härte des Wassers. So zeigt bidestilliertes Wasser die beste Ozonaufnahme. Die Wasserhärte wurde elektrometrisch bestimmt (bis pH 4,4).

Nach längerer Ozonisierung des Wassers war ein geringer weißlicher Niederschlag auf dem Grund des Versuchsbeckens festzustellen, was mich dazu veranlaßte, vor und nach dem Versuch die Härte des Wassers zu kontrollieren. Die Deutsche Carbonathärte betrug im Ausgangswasser  $15,28^\circ$ . Am Ende des Versuches nahm die Carbonathärte ab, und zwar betrug der Wert  $14,39^\circ$ . Aus diesen Ergebnissen ist zu entnehmen, daß ozonisiertes Wasser eine andere Carbonathärte annimmt.

## b) Blutuntersuchungen

Bei allen Forellen erfolgte die Blutentnahme durch Herzpunktion (LEUTELT, 1960); dafür wurden genügend starke und innenpolierte Kanülen (1404/15 Ibo.) verwendet, so daß nach dem Einstich ins Herz das Blut gut ablief, ohne daß eine Spritze zuhelfe genommen werden mußte. Beim Ansaugen des Blutes mit der Spritze kommt es oft durch vorhandene Schaumbildung zu Hämolyseerscheinungen. Die Kanüle wurde in die Mitte der durch den kranialen Ansatz der beiden Brustflossen gezogenen Linie ungefähr 1 cm tief eingestochen. Die Blutausschüttung, ungefähr 3 ml, war ausreichend für die vorzunehmenden Untersuchungen. Auf gerinnungshemmende Mittel konnte verzichtet werden, da die Zeit bis zur Gerinnung des Blutes ausreichte, um die einzelnen Bestimmungen durchzuführen. Alle Fische wurden vor der Herzpunktion gründlich abgetrocknet, damit keine Wasser- und Futterbeimengungen das Blut verunreinigten. Die unbehandelten Vergleichsfische und alle Versuchsfische wurden durch MS 222 (Sandoz) betäubt. Bei dem MS 222 handelt es sich um ein gutes Narkosemittel für Kaltblüter, das im allgemeinen sehr gut von den Fischen vertragen wird. Chemisch ist MS 222 ein Aethyl-m-Aminobenzoat. Die Regenbogenforelle wurde in eine Lösung von 1:25.000 verbracht, in der ungefähr nach 4 bis 5 min. die Narkose einsetzte. Über den Einfluß der MS 222-Narkose auf die einzelnen Blutkomponenten berichteten WEDEMEYER (1970) und MOLNAR und TAMASSY (1970). Danach sind keine wesentlichen Veränderungen der Blutwerte festzustellen.

Folgende Blutuntersuchungen wurden durchgeführt:

Erythrozytenzahl

Leukozytenzahl

Hämatokritwert

Hämoglobingehalt

Blutzuckerspiegel

Gesamteiweiß

Elektrophorese des Serums

### Erythrozytenzahl

Die Erythrozytenzählung wurde mit der Erythrozytenpipette und der Zählkammer nach NEUBAUER durchgeführt. Das Fischblut wurde bis zur Marke 0,5 der Pipette aufgezogen und dann mit Hayem'scher Lösung bis zum Teilstrich 101 verdünnt und anschließend gut gemischt. 5 x 16 Quadrate der Zählkammer wurden für die Bestimmung der Erythrozytenanzahl ausgezählt.

$$\frac{\text{Gesamtzahl d.gezählt.Erythrozyten}}{\text{Ausgezählte Fläche x Kammerhöhe x Blutverd.}} = \text{Erys/mm}^3$$

### Leukozytenzahl

Das Bestimmen und Auszählen der Leukozyten beim Fisch ist mit einigen Schwierigkeiten verbunden, da auch Fischerythrozyten Kerne besitzen und die Essigsäure enthaltende Verdünnungsflüssigkeit für Leukozyten zwar das Plasma der Erythrozyten zerstört, nicht aber ihre Kerne. Die Größe der Lymphozyten und der Erythrozytenkerne ist in etwa gleich, so daß keine einwandfreie Auszählung nach der herkömmlichen Methode möglich ist.

Nach SCHÄPERCLAUS (1954) und DOMBROWSKI (1953) kann man die Leukozyten im gefärbten Ausstrichpräparat bestimmen. Diese Methode ist nach TOPF (1955) zu ungenau, da die Leukozytenanzahl am Anfang eines Ausstriches viel größer ist als am Ende. Aus diesem Grunde wurde eine Färbemethode eingeführt, die von SHAW (1930) für Vogelleukozytenfärbung entwickelt und von KATZ (1949) für die Fische übernommen wurde. Bei den Vögeln tauchte dieses Problem ja ebenfalls auf, da auch Vogelerythrozyten Kerne besitzen. Zwei Lösungen werden benötigt:

|             |                 |          |
|-------------|-----------------|----------|
| I. Lösung:  | Neutralrot      | 25 mg    |
|             | Natriumchlorid  | 0,9 g    |
|             | Aqua dest.      | 100,0 ml |
| II. Lösung: | Kristallviolett | 12 mg    |
|             | Natriumcitrat   | 3,8 g    |
|             | Formalin        | 0,4 ml   |
|             | Aqua dest.      | 100,0 ml |

Lösung I muß jeden Tag neu angesetzt werden, während Lösung II sich sieben Tage hält. Vor Gebrauch sind beide Lösungen zu filtrieren. Das Blut wird hier ebenfalls bis zur Marke 0,5 in einer Erythrozytenpipette aufgezogen und dann je zur Hälfte mit Lösung I und II bis zum Teilstrich 101 aufgefüllt. Nach gutem Durchschütteln kann man nach 10 min. mit der Auszählung der Leukozyten in der Zählkammer beginnen. Bei dieser Färbemethode besteht die Möglichkeit, sowohl die Erythrozyten als auch die Leukozyten auszuzählen, da sich bei den Erythrozyten nur der Kern und bei den Leukozyten Kern und Plasma anfärben.

### Hämatokrit

Der Hämatokritwert gibt an, welches Volumen die Erythrozyten in 100 ml Blut einnehmen. Wasserver-schiebungen zwischen Plasma und Erythrozyten sowie zwischen Blut und extravasalen Flüssigkeitsräumen sind über den Hämatokritwert zu erkennen. Die Hämatokritwerte wurden mit der Mikro-Hämatokrit-Zentrifuge ermittelt. Die heparinisierten Mikro-Hämatokritröhrchen (innerer Durchmesser 1,1 bis 1,2 mm, Länge 75 mm) wurden 3/4 mit Blut gefüllt, das mit einer roten harke gekennzeichnete Ende zugeschmolzen und bei über 3000 Umdrehungen 15 min. lang zentrifugiert. Pro Schleuderteiler konnten 24 Proben zentrifugiert werden. Um genauere Werte zu erhalten, stellte ich pro Fisch zwei Hämatokritwerte fest. Ein von der Firma Hettiche konstruiertes Ablesegerät ermöglichte eine schnelle Feststellung der prozentualen Verhältnisse Erythrozyten zu Plasma.

### Hämoglobingehalt

Die Bestimmung des Hämoglobins wurde nach der CYAN-Hämoglobinmethode durchgeführt. Dabei wird Hämoglobin durch Kaliumferricyanid zu Hämoglobin oxydiert. Dieses reagiert mit Kaliumcyanid und es entsteht Cyanhämoglobin. Cyanhämoglobin besitzt eine stabile Färbung, die dann mit dem Photometer (Elko II) gemessen wurde. Für diesen Nachweis wurden nur 0,02 ml Blut benötigt, was bei der doch geringen Fischblutmenge sehr vorteilhaft war.

Mit Hilfe von Cyanhämoglobin-Standardlösung wurde eine Verdünnungsreihe aufgestellt, die das Anlegen einer Eichkurve ermöglichte (siehe Abb.7).

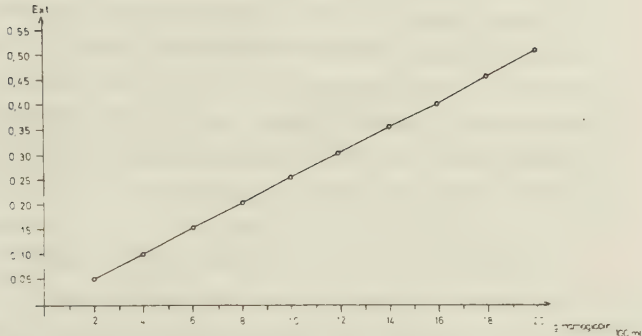


Abb.7 Hämoglobin-Eichkurve

### Blutzuckerspiegel

Die Blutzuckerbestimmung wurde nach der o-Toluidin-Methode nach HULTMANN (1959) durchgeführt. Als Biochemica Test-Kombination liefert die Firma Boehringer, Mannheim, die notwendigen Reagenzien. Glucose (auch Galaktose und Mannose) ergibt im essigsauren Milieu mit o-Toluidin bei Erhitzen eine blaugrüne Farbe. Die Farbstärke wurde im Photometer (Elko II) gemessen. An Fischblut wurde pro Probe 0,1 ml benötigt.

### Gesamteiweiß

Das Gesamtserum-Protein wurde nach der Biuretmethode bestimmt. Dabei gehen Eiweißkörper mit Kupfersalzen in alkalischer Lösung eine intensiv violettblau gefärbte Kupferkomplexverbindung ein. Diese Färbung wurde mit dem Eppendorf Photometer gemessen. Als Standardlösung mit bekanntem Proteingehalt wurde "Lab-Trol" von der Firma Dade benutzt. An Fischserum wurde für diese Bestimmung 0,1 ml benötigt.

### Elektrophoretische Serumuntersuchungen

Die elektrophoretische Auftrennung der Fischseren erfolgte durch die Disc-Elektrophorese nach DAVIS (1964). Als Trägermedium wurde Polyacrylamid (PAA) verwendet. Die PAA-Elektrophorese stellt z.Z. eine der besten Auftrennungsarten für die Serumproteine dar. Es wurde ein 5,75%iges Trenngel mit TRIS-Trenngelpuffer (pH 8,9) sowie ein Sammel- und Probengel-Monomergemisch mit einem pH von 6,7 benutzt. Als Elektrodenpuffer diente TRIS-Glykokollpuffer mit einem pH von 8,5 und 1:6 verdünnt. Die für die Elektrophorese verwendeten Glasröhrchen waren 110 mm lang und hatten einen inneren Durchmesser von 6 mm. Pro Röhrchen wurde eine konstante Stromstärke von 4 mA über 120 min. angelegt. 0,01 ml Forellenserum wurde in jedem Röhrchen aufgetrennt und nach beendeter Elektrophorese mit Amidoschwarz 10 B angefärbt. Die photometrische Auswertung der Gele erfolgte im Photometer PL 4 der Firma Zeiss mit angeschlossenem Schreiber. In die erhaltenen

Pherogramme wurden die einzelnen Proteinkomponenten eingezeichnet und als R-Werte registriert. Die Strecke Start - Albuminmitte betrug 100.

### c) Histologische Untersuchungen

Nach der Tötung der Versuchs- und Kontrollfische wurde eine sofortige makroskopische Untersuchung vorgenommen. Anschließend wurden die Gewebeproben für die histologischen Untersuchungen der Kiemen, der Haut und der Leber vom Fisch entnommen. Die Fixierung erfolgte durch Formalin 1:10, Bouin oder Susa. Alle Gewebsteile wurden nach der Fixation und der sich anschließenden Alkoholreihe in Paraffin eingebettet und histologische Schnitte in einer Dicke von 7-10  $\mu$  angefertigt. Für die Färbung der Schnitte wurde die Hämatoxylin-Eosin-, van Gieson- und Goldner-Färbung verwendet (ROMEIS, 1968).

## II. Ergebnisse

### 1. Das klinische Verhalten der Fische unter Ozoneinfluß

Aus technischen Gründen war es mir nur möglich, mit einer Ozonkonzentration von 0,024 mg Ozon/l Wasser zu arbeiten. Trotz dieser einheitlichen Versuchsbedingungen gab es bei den Versuchstieren eine unterschiedliche Resistenz gegenüber diesem starken Oxydationsmittel. Wie aus der Abbildung 8 zu ersehen ist, reicht die Sterbequote der Fische von 1 bis zu 24 Stunden. Schon HUBBS (1930) wies in seiner Arbeit auf die unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Ozon hin. Es ist aber notwendig, meßbare Größen zur Bestimmung der Giftwirkung

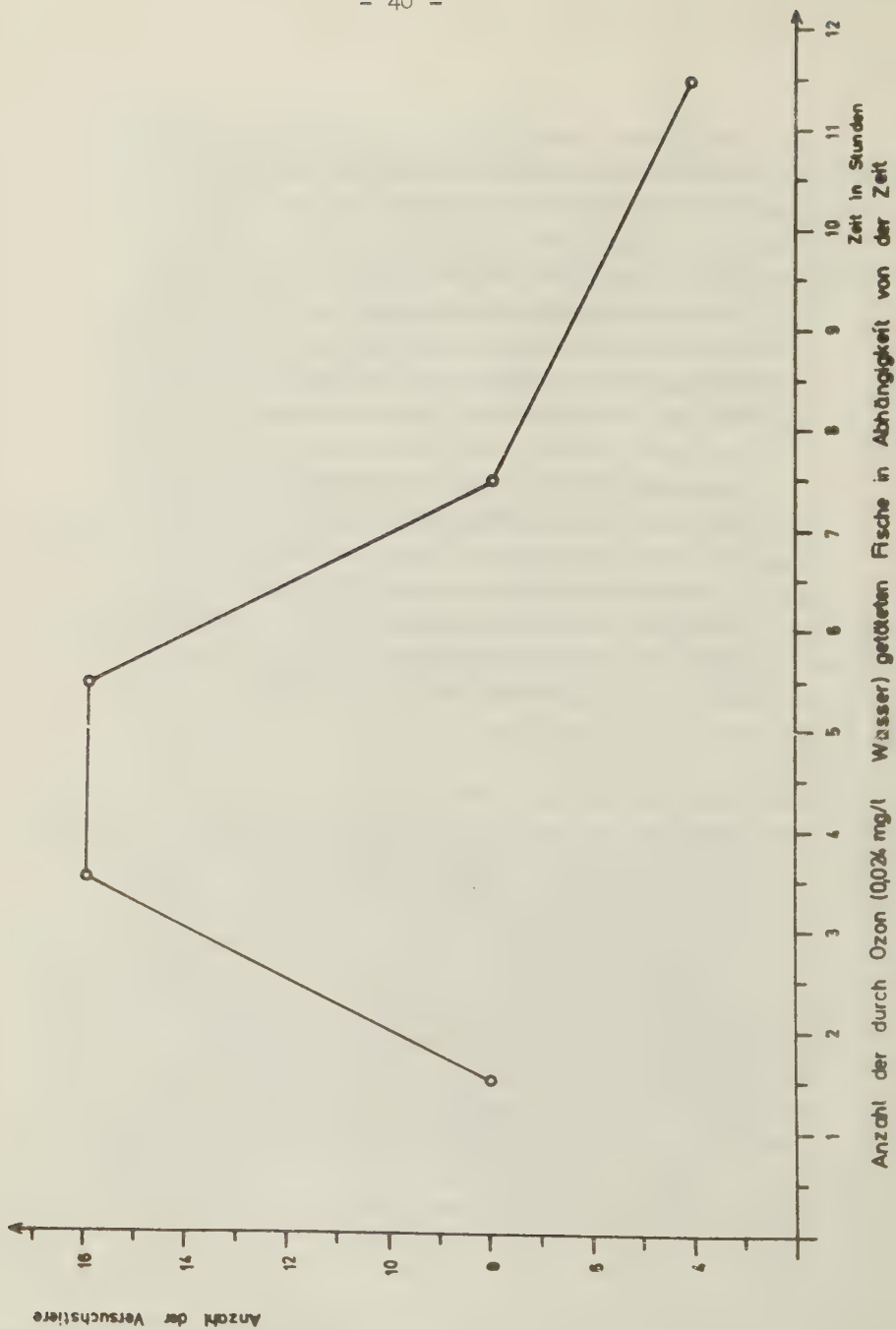


Abb. 2

einer Substanz aufzustellen. Dafür eignet sich gut das von REICHENBACH-KLINKE (1971) veröffentlichte Schema. Danach kann man die Stadien der Fischvergiftung in vier Phasen einteilen.

1. Die Diffusionsphase:

In diesem Zeitabschnitt dringt der Giftstoff in das Wasser ein und wird abhängig von der Turbulenz des Wassers gleichmäßig verteilt. Es kommt zum ersten Kontakt der Fische mit dem Gift.

2. Infiltrationsphase:

Es kommt zu den ersten Reaktionen bei den Fischen, da der Giftstoff in das Gewebe eindringt. Neben einem Abweichen vom normalen Schwimmverhalten, einer Freßunlust und starker Unruhe erhöht sich die Frequenz der Atembewegung.

3. Manifestationsphase:

In dieser Phase treten deutliche Gleichgewichtsstörungen auf. Die Organe der Fische sind zum Teil schon geschädigt. Die Haut und die Kiemen verschleimen stark, so daß der Fisch eine hellgraue, stumpfe Farbe erhält. Das Luftholen wird permanent und in den Bewegungen der Tiere löst sich ein Dahintreiben mit einem plötzlichen Umherschießen ab. Wird der Fisch gegen Ende dieser Phase in frisches Wasser umgesetzt, so kann er sich, abhängig von der Art des Giftes, wieder erholen. Ist das Gift zu stark gewesen, so behält der Fisch einen Dauerschaden, der dann bald zum Tode führt.

#### 4. Destruktionsphase:

Die Giftwirkung ist so stark, daß es zu irreversiblen Schädigungen der Organe kommt. Die Fische treiben mit dem Bauch nach oben und die abgespreizten Kiemendeckel lassen kaum noch Atembewegungen erkennen. Die Länge dieser Phase richtet sich nach der Größe der Oberfläche des Fisches, nach vorhandenen latenten Krankheiten oder Parasiten.

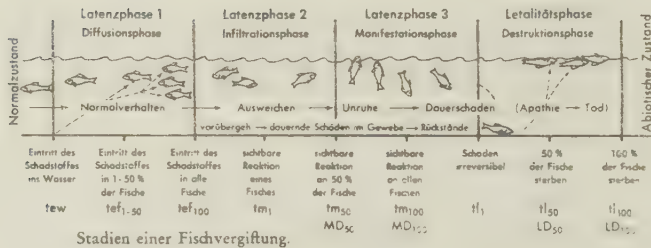


Abb.9 Die verschiedenen Stadien der Fischvergiftung  
(nach REICHENBACH-KLINKE, 1971)

Die in diesen einzelnen Phasen beschriebenen Vergiftungserscheinungen beim Fisch entsprachen im großen und ganzen auch dem Bild meiner Versuchsfische. Danach wurde am Anfang der Diffusionsphase

das Wasser mit Ozon durchmischt. Während des Eintritts des Schadstoffes, also der Infiltrationsphase, zeigten die Tiere eine starke Anfangsunruhe. Dazu trug sicherlich auch das Umsetzen der Fische in das Versuchsbecken bei. Es war auch eine Überempfindlichkeit festzustellen. Das Heben eines Gegenstandes vor dem Becken ließ die Forellen im Aquarium wild umherschließen. Diese Reizbarkeitsstörungen veranlaßten mich dazu, das Aquarium von zwei Seiten abzdunkeln, da die Tiere sich sonst erheblich verletzt hätten. Daneben traten auch zuckende und ruckartige Körperbewegungen mit spasstischem Kopfschütteln auf. Die Atemfrequenz war erhöht. Die Zahl der Atembewegungen ist von der Wassertemperatur und dem Sauerstoffgehalt des Wassers abhängig. So beschreibt SUWOROW (1959) für die Forellen folgende Atemfrequenzen:

bei  $10^{\circ}\text{C}$  und  $7,5\text{ cm}^3\text{ O}_2/1 = 60$  bis  $70$  Atembewegungen  
 $10^{\circ}\text{C}$  und  $2,0\text{ cm}^3\text{ O}_2/1 = 140$  bis  $150$  Atembewegungen

In diesem Stadium konnte ich bei den Versuchsfischen eine Atemfrequenz von  $120$  bis  $130$  feststellen. Auffallend war auch das Erbrechen von Futter, was zu einer erheblichen Trübung des Wassers führte.

Die 3. Phase war gekennzeichnet durch das Auftreten von Gleichgewichtsstörungen. Das äußerte sich in Taumeln, Wippen sowie Seiten- und Rückenlage. Zeitweise war es dem Fisch aber möglich, seine normale Lage wieder einzunehmen. Auf ein Klopfen hin war keine Reaktion der Fische zu bemerken. Auffallend war auch das plötzliche Umherschließen und Wälzen im Aquarium. Einige Fische hielten sich nur auf dem Boden des Beckens auf.

Die nach Ende der Manifestationsphase aufgetretenen Schäden an den Fischen sind irreversibel und die Fische, die in frisches Wasser gesetzt wurden, erholten sich nicht wieder. Nur wenige Fische erschienen an der Oberfläche, um nach Luft zu schnappen, wie es für die Asphyxie typisch ist. Die Atemfrequenz ging auf 60/Minute zurück.

Die Destruktionsphase war dadurch gekennzeichnet, daß der Fisch bauchaufwärts trieb, was nur manchmal von Krämpfen unterbrochen wurde. Die Atembewegungen waren nur schwach und undeutlich wahrzunehmen. Das Maul war dauernd geöffnet. Die Farbe der Fische war dunkler als im normalen Zustand. Von der Haut hingen Schleimfetzen herab. Auf den Kiemen war rötlicher Schleim zu sehen. Der Fisch starb kurze Zeit nach dem Auftreten dieser Symptome.

Hatte der Fisch den Anfang des irreversiblen Stadiums erreicht, so betäubte ich ihn und entnahm das Blut für die Untersuchungen (siehe Abb.10)



Abb.10 Durch Ozon verursachte Haut- und Flossenblutungen

## 2. Das normale Blutbild von Forellen

### a) Die korpuskulären Bestandteile

Um Vergleiche anstellen zu können, muß man zuerst einmal die Normalwerte, also die Werte von gesunden Fischen ermitteln. Aus der Literatur ist zu entnehmen, daß es für die Anzahl der korpuskulären Bestandteile des Blutes keine Übereinstimmung gibt. Neben den Erythrozyten, die den Hauptanteil der Blutkörperchen ausmachen, gibt es die Leukozyten, die Thrombozytoblasten, die Lymphozyten und die Thrombozyten (TOPF und DOMBROWSKI, 1953). Über das Aussehen und die Funktion der zuletzt genannten Körperchen scheint man aber nicht ganz sicher zu sein. Nach FIEBIGER (1927) soll für alle Fische ein Normalwert von 1,5 Mio Erythrozyten/mm<sup>3</sup> Blut zutreffen. Dagegen behauptet SCHLICHER (1927), daß für die Selachier eine Schwankungsbreite von 1,4 bis 2,3 Mio/mm<sup>3</sup> vorliegt, was er in ähnlichem Ausmaß, nämlich mit 0,7 bis 2,0 Mio/mm<sup>3</sup> Blut bei den Teleostiern feststellte. Eine eingehende Arbeit veröffentlichte SCHLICHER (1927) auch über die Anzahl der roten Blutkörperchen der Bachforelle mit 1,14 Mio/mm<sup>3</sup> und für die Regenbogenforelle mit 1,1 Mio/mm<sup>3</sup>. Er stellte weiterhin fest, daß die Salmoniden zwar eine geringere Blutkörperchenanzahl aufweisen, dafür aber die Blutzellen größer sind. REICHENBACH-KLINKE (1966) gibt für die Regenbogenforelle einen Wert von 1,02 bis 1,37 Mio Erythrozyten/mm<sup>3</sup> an.

So ist es von Interesse, daß die Blutkörperchenanzahl bei den Fischen je nach den Lebensumständen großen

Schwankungen unterworfen sein kann. So fand SCHLICHER (1927) bei manchen Fischen deutliche Schwankungen, hervorgerufen durch die Laichzeit und die durch die Jahreszeiten bedingten Temperaturänderungen. Nach SCHLICHER steigt die Blutkörperchenanzahl vor dem Laichen an und vor dem Winter erfolgt ein allmähliches Absinken. Auch das Alter soll nach SCHLICHER und DABROWSKI (1953) seine Auswirkungen haben, denn beide konnten bei jungen Karpfen weniger weiße Blutkörperchen finden als bei alten Tieren. Während das Geschlecht und die Beschuppung keinen Einfluß auf die Anzahl der Blutkörperchen haben soll, wurde von HOFMEYER (1907) und SCHLICHER (1927) eine durch Hunger bedingte Verminderung der weißen und roten Blutkörperchen festgestellt. Die Anzahl der weißen Blutkörperchen variiert in etwa den gleichen physiologischen Schwankungen, wie sie bereits bei den Erythrozyten erwähnt wurden. Der Normalwert beträgt bei allen Süßwasserfischen mehr als 10.000/mm<sup>3</sup>. Auch hier gibt es sehr unterschiedliche Zahlenangaben der Autoren über die Anzahl der Leukozyten. Nach SCHLICHER (1927) besitzt die Regenbogenforelle 34.000 Leukozyten/mm<sup>3</sup>. REICHENBACH-KLINKE et al. (1966) zählten 25.000 bis 38.000 Leukozyten aus. Nach SCHÄPERCLAUS (1954) soll bei den Salmoniden die geringste Differenzierung der weißen Blutkörperchen auftreten.

Die von mir gefundene Leukozytenanzahl bei gesunden Regenbogenforellen lag zwischen 16.000 und 54.000/mm<sup>3</sup>, so daß ein Mittelwert von 29.680 Leukozyten/mm<sup>3</sup> entstand. Dieser Wert scheint mir mit den oben angegebenen Zahlen recht gut übereinzustimmen.

STEFFENS (1955) wies darauf hin, daß es keinen festgelegten Normalwert geben kann, da gerade die Erythrozyten einem großen Schwankungsbereich unterliegen können.

Meine eigenen Untersuchungsergebnisse über die Blutkörperchenanzahl bei gesunden und unbehandelten Fischen lagen in der Nähe der bisher zitierten Angaben über Forellenerythrozyten. Die Werte lagen zwischen 710.000 und 1,62 Mio Erythrozyten/mm<sup>3</sup> Blut. Aus diesen Zahlen ergab sich ein Mittel von 1,17 Mio Erythrozyten.

#### b) Der Hämatokrit

Um das Verhältnis zwischen roten Blutkörperchen und Serum festzustellen, bedient man sich des Hämatokritwertes. Verändert sich die Anzahl der Erythrozyten oder liegen anteilmäßige Veränderungen im Serum vor, so ändert sich auch der Hämatokritwert. REICHENBACH-KLINKE et al. (1966) fanden bei gesunden Forellen einen Hämatokritwert von 40-50%/100 ml Blut.

HALSBAND (1963), der die Veränderungen des Blutbildes von Fischen infolge toxischer Schäden untersuchte, stellte fest, daß eine Verkleinerung oder Vergrößerung des Hämatokritwertes von der Art des einwirkenden toxischen Stoffes abhängig ist.

SNIESZKO (1961) stellte bei seinen Untersuchungen einen Wert von 47,8 %/100 ml Blut fest. Dieser Wert wurde von SNIESZKO dadurch ermittelt, daß er, über ein ganzes Jahr verteilt, jeden Monat seine Messungen

durchführte, und so den Mittelwert von 47,8 %/100 ml Blut festlegte. Weiterhin berücksichtigte er auch Rasse, Alter und Geschlecht der Fische. Die sonst noch bei den Autoren auftretenden unterschiedlichen Hämatokritwerte sind doch wohl in erster Linie auf die verschiedenen Bestimmungsmethoden, die Art der Blutentnahme und die verwendeten gerinnungshemmenden Mittel zurückzuführen.

HAIDER (1969) ermittelte bei seinen Untersuchungen über den Einfluß der Fangmethode auf die verschiedenen Blutwerte der Regenbogenforelle einen Hämatokritwert von 30 %/100 ml Blut. Der von mir ermittelte Hämatokritwert bei den Kontrollfischen durch die Mikro-Hämatokrit-Methode betrug 49,5 %/100 ml Blut.

### c) Das Hämoglobin

Das Hämoglobin der Fischerythrozyten erfüllt aufgrund seiner chemischen Struktur und des Sauerstoffbindungsvermögens die gleiche Aufgabe wie beim Säugetierblut. Allerdings scheint die Resistenz gegen CO größer zu sein als bei den Säugetieren. ANTHONY (1960) konnte bei Goldfischen durch CO keinen Tod verursachen, wenn er gleichzeitig die Temperatur erniedrigte. Für Säugetiere wäre diese CO-Konzentration in kürzester Zeit tödlich gewesen. Es gibt Fische, bei denen überhaupt das Hämoglobin fehlt, wie z.B. bei jungen Aalen und *Chaenocephalus aceratus*. Die meist geringe O<sub>2</sub>-Kapazität des Blutes, der geringe O<sub>2</sub>-Gehalt des arteriellen Blutes und das geringe Blutvolumen der Fische deutet auf eine geringere Rolle des Hämoglobins hin als es bei den Landwirbeltieren der Fall ist. Nach v.BUDDENBROCK (1967) soll das

Hämoglobin bei gesunden Fischen dem Körper nur einen Teil des Sauerstoffs zuführen, während der übrige Sauerstoffbedarf durch Hautdiffusion gedeckt wird. Wie groß ist nun der Hämoglobingehalt der Erythrozyten? Nach STEFFENS (1955) hängt der Hämoglobingehalt des Blutes von der Anzahl der Erythrozyten und vom Hämoglobingehalt des einzelnen roten Blutkörperchens ab. SCHLICHER (1927) behauptet, daß der Hämoglobingehalt bei allen Fischen gleich groß sei und vor dem Abbläichen ansteige, um später wieder die alte Höhe zu erreichen. Der Normalwert beträgt bei der Regenbogenforelle nach SCHLICHER (1927) 60 % (100 % entspricht 16 g% Hämoglobin). REICHENBACH-KLINKE (1966) konnte einen Hämoglobingehalt von 50-110 % bei der Forelle ermitteln. HALL und GRAY (1929) fanden heraus, daß lebhaftere Oberflächenfische einen höheren Hämoglobinwert besitzen als träge Grundfische. STEFFENS (1961) bestimmte bei Forellen nach der Cyanhämoglobin-Methode den Hb-Gehalt und kam auf einen Wert von 7,84 g/100 ml Blut. LARSEN und SNIESZKO (1961) kamen bei der Regenbogenforelle auf einen Hb-Wert von 10,04 g/100 ml Blut. Auch bei der Hämoglobinbestimmung traten also bei den hier zitierten Autoren Abweichungen auf.

Bei den gesunden Fischen konnte ich Hb-Werte von 5,5-13,0 g/100 ml Blut feststellen, die dann den Mittelwert von 10,0 g/100 ml Blut ergaben.

#### d) Der Blutzucker

Der Blutzucker spielt als Energiequelle eine große Rolle im Leben der Fische. Die Kohlenhydrate werden

mit dem Futter aufgenommen, in ihre Bausteine zerlegt und gelangen als Monosaccharide in die Blutbahn. In der Leber werden die Monosaccharide zu Glykogen assimiliert und hier als tierische Stärke gespeichert. Bei Bedarf kann das Glykogen jederzeit als Glukose an das Blut abgegeben werden. Ebenso enthält die Muskulatur Glykogen, das die Energie für die Muskelbewegungen liefert und dabei zu Milchsäure abgebaut wird. Der Nachschub an Glykogen für die Muskulatur erfolgt aus der Leber. Die Koordination dieser komplizierten Vorgänge erfolgt durch Hormone, die ihrerseits wieder die Fermente aktivieren, die für diese Vorgänge notwendig sind. Neben der Oxydationsmittel reduzierenden Glukose enthält das Blut noch andere Reduktionsmittel, wie z.B. Harnsäure, Kreatinin und Glutathion. Diese Stoffe bilden zusammen die sogenannte Restreduktion. Diese Restreduktion beträgt nach KIERMEIR (1940) bei Knochenfischen 18-25 mg%. Über die Bindung von Glukose an Bluteiweißkörper berichtet GRAY et al. (1930). Er ist der Meinung, daß die Menge der an die Bluteiweißkörper gebundenen Glukose sehr niedrig sei. AMLACHER (1957) ist der Meinung, daß die Hauptmenge der Glukose nicht an die Blutkörperchen, sondern in der Hauptsache an das Plasma gebunden ist. Nach LASZLEBEN (1937) wird der Blutzuckerspiegel durch verschiedene Faktoren beeinflußt. So behauptet er, daß der Versand, die Verletzungen, die Ernährung, die Leberverfettung bei Forellen und bei Milchnern vor der Laichzeit eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels hervorrufen. Nach KIERMEIR (1940) ist

die Jahreszeit, die Wassertemperatur, die Betäubung, die Ernährung und eine normale Arbeitsleistung ohne Einfluß auf den Blutzuckerwert. Bei großer und langanhaltender Arbeitsleistung soll der Blutzucker jedoch stark ansteigen. BLACK et al. (1962) untersuchten bei der Regenbogenforelle den Muskel-Glykogengehalt nach langer und starker Anstrengung und fanden heraus, daß nach einer rapiden Abnahme des Muskelglykogens eine starke Erhöhung des Lactat- und Pyruvat-Spiegels im Blut erfolgte, wobei das Lactat im Blut früher nachzuweisen war. Nach ROBL (1970) entsteht durch Aquariumshälterung keine Veränderung des Blutzuckerspiegels. Ist eine ungenügende Sauerstoffaufnahme für die Fische gegeben, z.B. bei der Blutentnahme, so soll sich nach LASZLEBEN (1937) der Blutzuckerspiegel erhöhen. Sowohl KIERMEIR (1940) als auch AMLACHER (1957) konnten keine Erhöhung des Blutzuckerspiegels als unmittelbare Folge eines eingetretenen Sauerstoffmangels durch Betäubung feststellen. Nach SIMPSON (1926) soll diese erst nach 30 bis 40 min. auftreten. WHITE (1928) gibt für *Squalus sucklii* ein Absinken des Blutzuckers bei  $O_2$ -Mangel an. MUNNICH (1958) untersuchte die Zusammenhänge zwischen dem Sauerstoffgehalt des Wassers und dem Blutzuckerspiegel des Karpfens und kam zu dem Ergebnis, daß sowohl eine starke Übersättigung als auch eine niedrige Sauerstoffkonzentration (keine Asphyxie) des Wassers keinen Einfluß auf die Höhe des Blutzuckerspiegels hat. Dagegen tritt bei Asphyxie nach 30 min. eine starke Erhöhung des Blutzuckers auf. MUNNICH (1958) und AMLACHER (1957)

bemerkten eine starke Erniedrigung des Blutzuckers durch die akute Form der Bauchwassersucht. Zwei Gruppen von Fischen unterscheiden PAWLOW und KROLIK (1936) nach der Höhe des Blutzuckers. Die erste Gruppe hat einen Blutzuckergehalt unter 50 mg/100 ml Blut. Dazu gehören Forelle, Lachs und Karpfen. Die zweite Gruppe besitzt einen Blutzuckerspiegel über 100 mg/100 ml, zu der er Zander, Blei und Schnäpel zählt.

LASZLEBEN (1936) gibt für die Regenbogenforelle einen Normalwert von 60 R.E. an. KIERMEIR (1940) stellt bei unbetäubten Forellen einen Blutzuckerwert von 74 mg und von Betäubten einen Wert von 69 mg /100 ml Blut fest. Einen Blutzuckerwert von 50,4 mg/100 ml Blut ermittelte HAIDER (1969). Bei Coregonen schwanken die Blutzuckerwerte zwischen 50 mg/100 ml im Sommer und 385 mg/100 ml im Winter (REICHENBACH-KLINKE et al., 1966).

Meine eigenen Untersuchungen ergaben bei den Kontrollfischen den hohen Blutzuckerwert von 98,7 mg/100 ml Blut.

#### e) Das Gesamteiweiß und die Elektrophorese

Die Serumproteine spielen bei den ablaufenden Lebensprozessen eine wichtige Rolle. Ändert sich ihre Zusammensetzung oder ihr Verhältnis zueinander, kann das ein Anzeichen für krankhafte Veränderungen im Organismus bedeuten. In diesem Zusammenhang kommt der Bestimmung der Globuline und der Albumine eine große Bedeutung zu. So spielen die Globuline bei der Abwehrfunktion des Körpers eine wichtige Rolle,

da die Menge der  $\gamma$ -Globuline Auskunft gibt über die vorhandenen Antikörper. Die wichtigsten Aufgaben dieser Serumproteine sind, kurz zusammengefaßt, folgende (nach WUHRMANN und WUNDERLY, 1952):

1. Regulation des kolloidosmotischen Druckes und damit des Wasserhaushaltes;
2. Transport der Nährstoffe, der Hormone und anderer Stoffe;
3. Abwehr von Infektionen, mit Hilfe der Antikörper;
4. Abtransport der Stoffwechselendprodukte der Zellen und Gewebe zu den Ausscheidungsorganen;
5. Blutgerinnung.

So sind Reaktionen der Serumproteine und anderer Blutbestandteile auch auf bestimmte toxische Umwelteinflüsse festzustellen. Leider beschränken sich diese Untersuchungen meist auf die Humanmedizin, so daß nur wenige Angaben über die Zusammensetzung und die Art der Serumproteine der Fische zu erfahren sind. Da eine quantitative Auswertung der aufgefundenen Proteine durch die Disc-Elektrophorese ungenau ist, wurde neben der Elektrophorese auch eine Gesamteiweiß- und Albuminbestimmung nach der Biuret-Methode durchgeführt. Die in der Literatur angegebenen Gesamteiweißwerte bei Fischen beziehen sich meistens auf den Karpfen. Auch hier ist wieder festzustellen, daß die angegebenen Werte großen Schwankungen unterliegen. So gibt DOMBROWSKI (1953) für gesunde  $K_2$  einen Wert von 2,5 bis 2,9 (2,73) g% an, während FLEMMING (1958) einen Wert von 1,9 bis 3,95 (2,83) g% fand. SORWATSCHEW (1957) erhielt wesentlich höhere Werte bei den Karpfen, nämlich 3 bis 4 g%. THURSTON (1967) untersuchte den Gesamteiweißgehalt von der Regenbogenforelle in Abhängigkeit

von der Jahreszeit und bei Beginn der Geschlechtsreife bei beiden Geschlechtern und stellte erhebliche Schwankungen fest. Der Einfluß der Sauerstoffschwankungen auf das Serumeiweißbild wurde von BOUCK und BALL (1965) untersucht. HAIDER (1969), der die alters- und saisonbedingten Veränderungen im Serumeiweißbild der Regenbogenforelle untersuchte, fand bei einjährigen Milchnern einen Wert von 3,4 g/100 ml und bei dreijährigen Milchnern einen Wert von 4,7 g/100 ml. Eine stärkere Erhöhung ist noch bei den Rognern vorhanden, nämlich von 3,6 g (1 Jahr) zu 6,3 g/100 ml (3 Jahre). Nach LIEBMANN, OFFHAUS und RIEDMÜLLER (1960); RIEDMÜLLER (1965) sollen Jahreszeit und Fütterung einen Einfluß auf den Gesamteiweißgehalt haben. Zu diesem Ergebnis kamen die obengenannten Autoren durch die Bestimmung der Flächenwerte von Pherogrammen, die sie durch die Papier-Elektrophorese erhielten. Dabei teilten sie die erhaltenen Integraph-Flächenwerte in vier Bewertungsklassen für den Gesamteiweißgehalt auf. Nach dieser Verfahrensmethode konnte der höchste Bluteiweißspiegel im August und September, eine Abnahme im Spätherbst und ein Minimum im Frühjahr festgestellt werden. SORWATSCHEW (1957) stellte während der Überwinterungsperiode bei Karpfen einen Abfall des Eiweißgehaltes von 3,8 bis 4 g% (Oktober) auf 2,7 bis 2,8 g% (März) fest. Nach LIEBMANN und Mitarbeitern (1960) findet bei Hungertieren zuerst ein Abbau der Albuminfraktionen statt, dem dann später auch eine Verringerung der Globuline folgt. Eine Geschlechtsabhängigkeit der Eiweißwerte soll nach DRILHON (1954) vorliegen, da er bei Rognern mehr Albumin und  $\alpha$ -Globulin als

bei den Milchneern nachweisen konnte. Bei seinen Untersuchungen über den Einfluß der Fangmethode auf die Blutzusammensetzung stellte HAIDER (1969) fest, daß der Gesamteiweißwert von 4,9 g/100 ml (nicht gejagt) auf 2,17 (gejagt) absinkt und die elektrophoretische Auftrennung des Serumeiweißes diese Hypoproteinämie deutlich wiedergibt.

Die von mir untersuchten Kontrollfische hatten einen Gesamteiweißgehalt von 3,37 g/100 ml mit einem Albuminanteil von 2,39 g. Zwischen diesen beiden Werten besteht eine Differenz von 0,98 g, die dann sogleich den Globulinanteil am Gesamteiweißgehalt darstellt. Das Albumin-Globulin-Verhältnis liegt bei 2,4.

### 3. Das Blutbild nach Ozoneinfluß

#### a) Die korpuskulären Bestandteile

Über den Einfluß des Ozons auf die Blutkörperchen der Fische gibt es bisher keine veröffentlichten Arbeiten. HUBBS (1930), der mit verschiedenen Fischarten und unterschiedlichen Ozonkonzentrationen zahlreiche Versuche unternahm, untersuchte aber nicht die Einwirkung des Ozons auf das Fischblut. Er kam aber bei seinen Versuchen zu dem Schluß, daß der Angriffspunkt des Ozons nicht das Blut sei, sondern die chemische Schädigung der oberflächlichen Körperzellen den Tod der Fische verursache. Es gibt aber auch Arbeiten, die sich mit dem Einfluß des Ozons auf das Blutbild beschäftigen. Diese Versuche wurden aber alle an Ratten und Meerschweinchen

durchgeführt, so daß diese Ergebnisse schon aufgrund der verschiedenen Umweltbedingungen nur begrenzt übertragbar sind. CUSHUY (1924) nimmt an, daß Ozon bereits vorher von der lebenden Materie abgebaut wird, so daß das Ozon keine Möglichkeit hat, unverändert vom Blut absorbiert zu werden. MAC EWEN und GECKLER (1968) konnten ebenfalls zwischen Kontroll- und Versuchstieren, die einem Ozonstrom von  $0,19 \text{ mg/m}^3$  Luft 90 Tage lang ausgesetzt wurden, keine Veränderung der Blutwerte nachweisen. Diese Ozonversuche an Warmblütern erstreckten sich über einen langen Zeitraum, so daß die Blutveränderungen, die vielleicht schon in der ersten Zeit auftraten, nicht erfaßt wurden.

Meine Untersuchungen verliefen über einen Zeitraum von 1 bis zu 24 Stunden. Durch die unterschiedliche Resistenz der Fische bedingt, traten die irreversiblen Gleichgewichtsstörungen zu verschiedenen Zeiten auf. Als Zeitpunkt für die vorzunehmenden Blutuntersuchungen wurde das Auftreten der irreversiblen Gleichgewichtsstörungen benutzt.

Anzahl der Erythrozyten in Mill. der Versuchsfische

| Versuchsdauer<br>in Stunden | Erythrozyten-<br>anzahl in Mill. | O <sub>3</sub> -Gehalt des<br>Wassers in mg/l | Temperatur<br>des Wassers |
|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------|
| Gruppe I: 2h                | 1,47                             | 0,024                                         | 8° C                      |
| " II: 3,5h                  | 1,34                             | 0,024                                         | 8° C                      |
| " III: 5,5h                 | 0,98                             | 0,025                                         | 8° C                      |
| " IV: 7,5h                  | 1,18                             | 0,024                                         | 8,2° C                    |
| " V: -24h                   | 1,40                             | 0,024                                         | 8,0° C                    |

Statistische Berechnung der Mittelwerte der Erythrozytenanzahl

a) Kontrollfische

$$M_1 = 1.173.170$$

$$f_1 = 40$$

$$s_1 = 40.942.000.000$$

b) Versuchsfische

$$M_2 = 1.231.785$$

$$f_2 = 27$$

$$s_2 = 117.470.814.814$$

F-Test:

Bei 1% Irrtumswahrscheinlichkeit ergibt sich für die Varianzen ein F-Wert von 2,86. Der Tabellenwert für die F-Verteilung:

$F_{TAB} = 2,25$ . Signifikanz liegt vor.

Da die beiden Varianzen bereits verschieden sind, ist der t-Test nicht anwendbar.

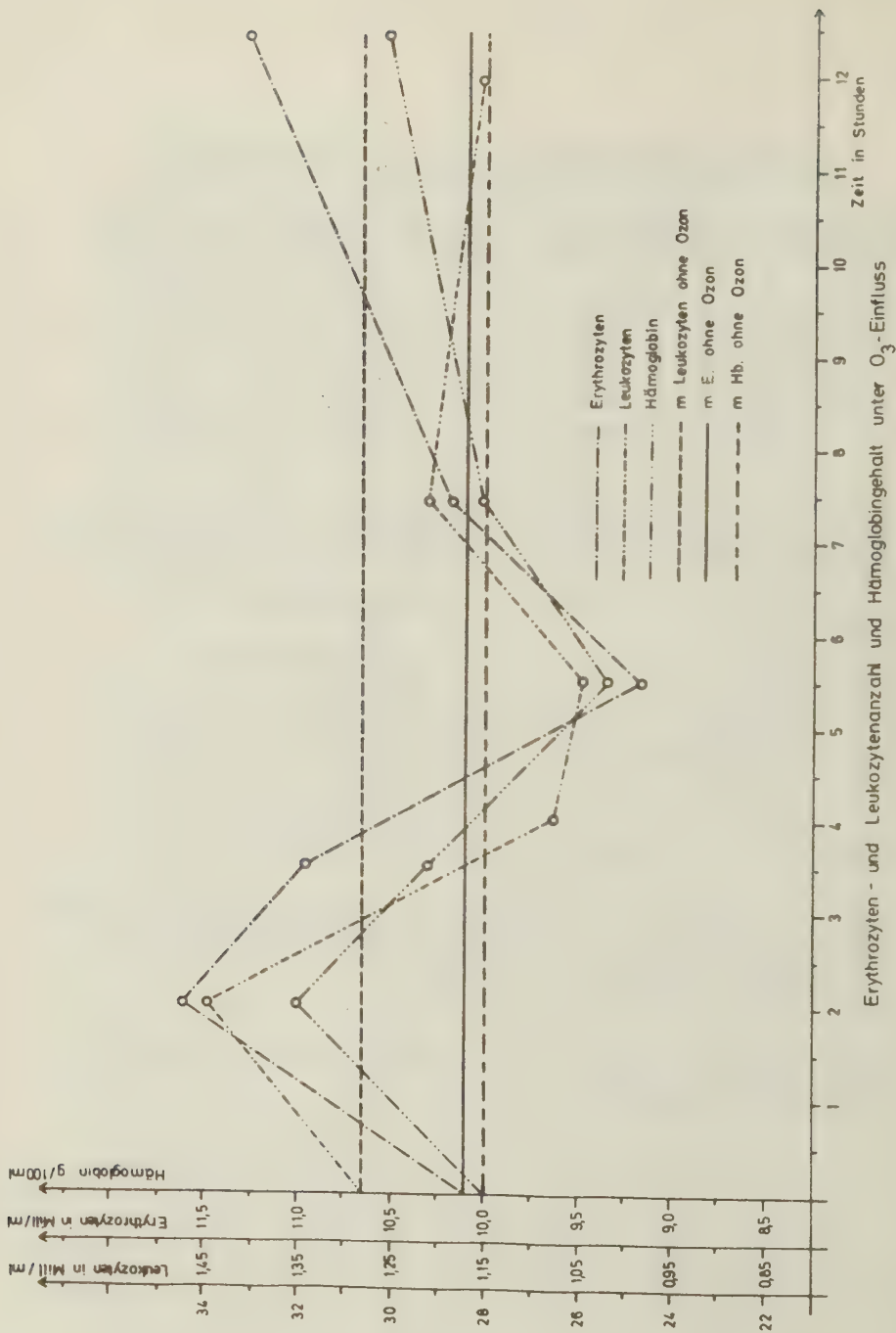


Abb. 11

Aus diesem Grunde war es mir nicht möglich, laufende Blutuntersuchungen vorzunehmen, um so die Veränderungen des Blutbildes nach bestimmten Zeiten festzuhalten. Die Ergebnisse über die gefundenen Erythrozytenwerte veranschaulicht die Abbildung 11. Daraus ist zu ersehen, daß die Erythrozytenanzahl nicht gleichmäßig linear zur Versuchsdauer verläuft. Mit Versuchsbeginn steigt die Erythrozytenanzahl an, um dann nach zwei Stunden das erste Maximum zu erreichen. Dieses erste Maximum trifft für die Gruppe II zu. Dabei wird die mittlere Erythrozytenzahl der Kontrollfische überschritten. In der Zeit von Beginn an bis zu 4,5 Stunden liegen die Erythrozytenwerte der Versuchsfische über dem Normalwert. Nach diesem ersten Maximum kommt es zu einem Abfall der Erythrozytenwerte, die ihren tiefsten Punkt dann nach 5,5 Stunden erreicht haben. Die Fische, die diesen Zeitpunkt überlebt haben, zeigen nach 4,5 Stunden einen Erythrozytenwert, der dem mittleren Wert der Kontrollfische entspricht. In der Zeitspanne von 4,5 Stunden bis zu 7,5 Stunden liegt die Erythrozytenanzahl der Versuchsfische unter dem Normalwert. Ist die Zeit von 7,5 Stunden überschritten, bewegen sich die Erythrozytenwerte wieder in der Nähe der Norm, um dann bei den nach 24 Stunden zur Untersuchung gekommenen Fischen ein erneutes Maximum zu erreichen. Vergleicht man nun die Gesamterythrozyten der Kontrollfische mit denen der Versuchsfische, so steigen die Werte von 1,17 Mio bei den Kontrollfischen auf 1,23 Mio Erythrozyten bei den Versuchsfischen an.

Die Werte für die weißen Blutkörperchen sind aus Abb.11 zu ersehen. Der Verlauf dieser Leukozytenlinie entspricht in etwa dem Verlauf der Erythrozytenwerte. Bei der Gruppe I, also nach einer mittleren Versuchsdauer von zwei Stunden, liegt ein Maximum der Leukozytenanzahl vor. Dieser Wert übersteigt die normale Anzahl der Leukozyten.

Anzahl der Leukozyten in Tausend der Versuchsfische

| Versuchsdauer<br>in Stunden |           | Leukozyten-<br>anzahl in Tausend | O <sub>3</sub> -Gehalt des<br>Wassers in mg/l | Temperatur<br>des Wassers |
|-----------------------------|-----------|----------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------|
| Gruppe                      | I: 2h     | 33,9                             | 0,024                                         | 8° C                      |
| "                           | II: 4h    | 26,5                             | 0,024                                         | 8° C                      |
| "                           | III: 5,5h | 25,8                             | 0,025                                         | 8° C                      |
| "                           | IV: 7,5h  | 29,1                             | 0,024                                         | 8,2° C                    |
| "                           | V: -12h   | 28,0                             | 0,024                                         | 8° C                      |

Statistische Berechnung der Mittelwerte der Leukozytenanzahl

a) Kontrollfische

$$M_1 = 29.682$$

$$f_1 = 40$$

$$s_1 = 10.708.000$$

b) Versuchsfische

$$M_2 = 27.017$$

$$f_2 = 27$$

$$s_2 = 7.552.000$$

F-Test:

Bei 1% Irrtumswahrscheinlichkeit ergibt sich für die Varianzen ein F-Wert von 2,10. Der Tabellenwert für die F-Verteilung:  $F_{TAB} = 2,39$ . Signifikanz liegt nicht vor.

t-Test:

Aus  $t = 0,76$  und  $t_{TAB} = 2,65$  bei einer 1%igen Irrtumswahrscheinlichkeit folgt, daß ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten nicht besteht.

Sehen wir uns nun die folgenden Gruppen II und III mit einer Versuchszeit von 4 bzw. 5,5 Stunden an, so ist ein starker Abfall der Leukozyten bis zu einem Wert von 25.800 festzustellen. Die Gruppe IV, mit einer Versuchsdauer von 7,5 Stunden, hat zwar wieder einen höheren Leukozytenwert, dieser liegt aber immer noch unter dem Normalwert. Der Normalwert wird auch von der Gruppe V nicht mehr erreicht, denn nach einer Zeit von 7,5 Stunden liegen alle Leukozytenwerte wieder tiefer. Werden alle Leukozytenwerte durch eine Linie verbunden, so können wir feststellen, daß ihr Verlauf in etwa dem der Erythrozyten entspricht und eine Erhöhung der Leukozyten nur in dem Zeitraum von 1 bis zu 3 Stunden vorliegt. Nach diesem Zeitpunkt liegen alle ermittelten Werte unter dem Leukozytenmittelwert der Kontrollfische. Vergleichen wir die Mittelwerte der Kontrollfische und der Versuchsfische, so stellen wir ein Absinken von 29.682 Leukozyten auf 27.017 Leukozyten der Versuchsfische fest.

b) Der Hämatokrit

Der Hämatokritwert, der das Volumen der Erythrozyten in 100 ml Blut angibt, dient dazu, Wasserverschiebungen zwischen dem Plasma und den

Erythrozyten sowie zwischen Blut und extravasalem Flüssigkeitsraum festzustellen. Die bisher vorliegenden Arbeiten über den Ozoneinfluß auf den Hämatokritwert wurden alle an kleinen Warmblütern durchgeführt, so daß nur eine bedingte Übernahme der Ergebnisse für die Fische möglich ist. JONES (1970) nimmt an, daß die geringen Hämatokritveränderungen hervorgerufen werden durch Sekundäreffekte der Ozonschädigungen, z.B. durch Veränderung des Körpergewichts und schlechter physischer Kondition. Die stärksten Veränderungen stellte SCHALM (1961) an Meerschweinchen fest, die er mit  $2,4 \text{ mg Ozon/m}^3$  Luft behandelt hatte.

Die in Abb.12 erscheinende Kurve des Hämatokrits erreicht, ebenso wie die Blutkörperchen und das Hämoglobin, nach 2 Stunden ein Maximum. Dieser Wert der Gruppe I nach 2 Stunden liegt bei 5,65 %. Der Hämatokrit für die Gruppe II und III liegt dann um einiges tiefer, nämlich bei 54,4 % bzw. 54,5 %. Ein starker Abfall der Blutwerte, wie es z.B. bei den Blutkörperchen der Fall war, tritt hier nicht ein. Danach gibt es sowohl für die Gruppe IV als auch für die Gruppe V wieder höhere Hämatokritwerte. Die von den verschiedenen Gruppen gebildete Hämatokritkurve unterschreitet kein einziges Mal den von den Kontrollfischen errechneten Normal-Hämatokritwert. Während für die Kontrollfische ein Hämatokritmittelwert von 49,5 % errechnet wurde, war bei den Versuchsfischen eine Erhöhung auf 55,1 % festzustellen.

Hämatokritwerte in % 100 ml Blut der Versuchsfische

| Versuchsdauer<br>in Stunden | Hämatokritwerte<br>in %/100 ml | O <sub>3</sub> -Gehalt des<br>Wassers in mg/l | Temperatur<br>des Wassers |
|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------|
| Gruppe I: 2h                | 56,5                           | 0,024                                         | 8° C                      |
| " II: 3,5h                  | 54,4                           | 0,024                                         | 8° C                      |
| " III: 5,5h                 | 54,5                           | 0,025                                         | 8° C                      |
| " IV: 7,5h                  | 55,4                           | 0,024                                         | 8,2° C                    |
| " V: -24h                   | 61,6                           | 0,024                                         | 8,0° C                    |

Statistische Berechnung der Mittelwerte des Hämatokrits

a) Kontrollfische

$$M_1 = 49,5$$

$$f_1 = 42$$

2

$$s_1 = 1.496.25$$

b) Versuchsfische

$$M_2 = 55,10$$

$$f_2 = 27$$

2

$$s_2 = 2.425.50$$

F-Test:

Bei 1% Irrtumswahrscheinlichkeit ergibt sich für die Varianzen ein F-Wert von 1,62. Der Tabellenwert für die F-Verteilung:

$F_{TAB} = 2,27$ . Signifikanz liegt nicht vor.

t-Test:

Aus  $t = 0,36$  und  $t_{TAB} = 2,65$  bei einer 1%igen Irrtumswahrscheinlichkeit folgt, daß ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten nicht besteht.

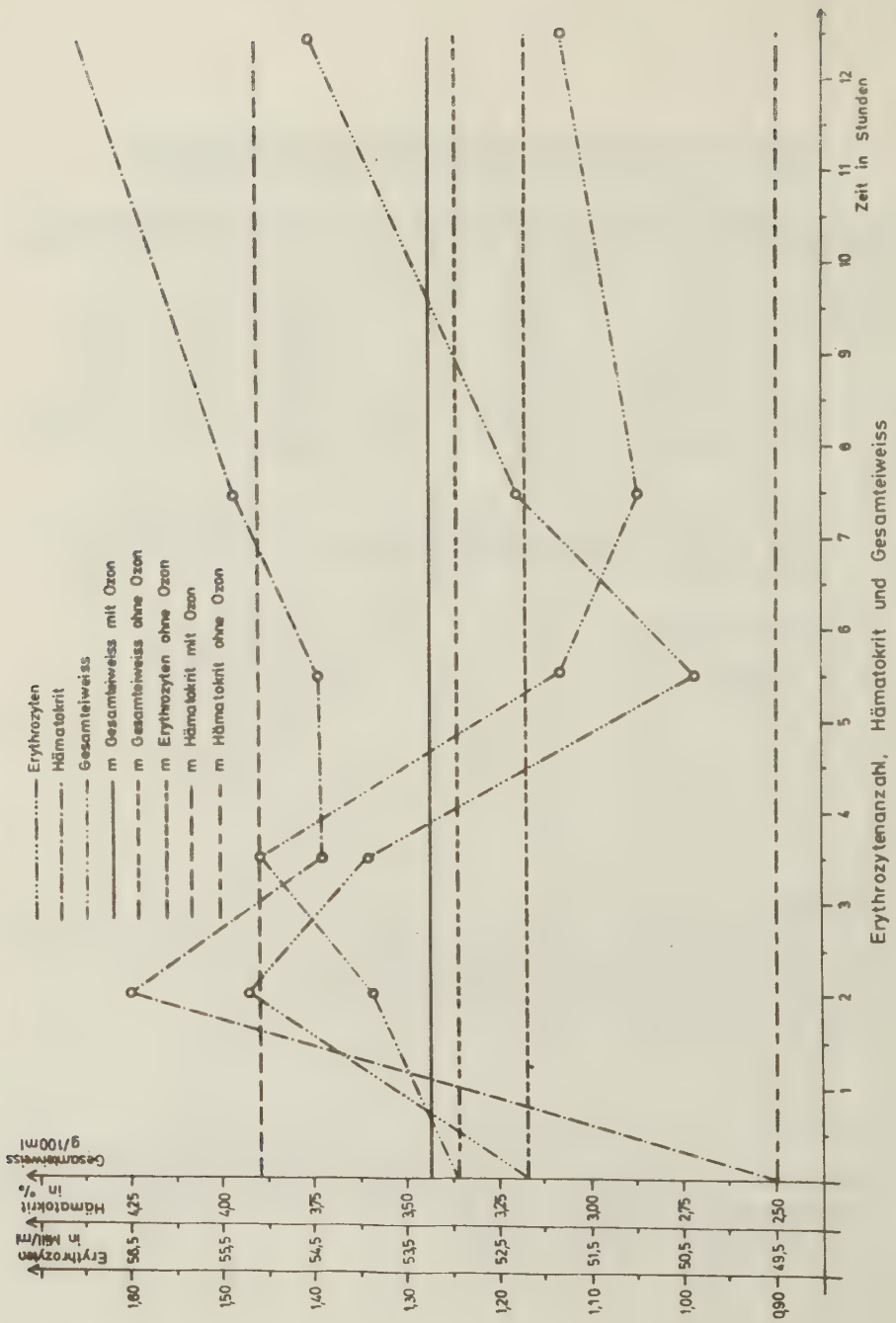


Abb. 12

### c) Das Hämoglobin

Die Anzahl der Erythrozyten gibt nicht allein Auskunft darüber, wieviel Hämoglobin im Blut vorhanden ist, sondern die Hämoglobinmenge kann sich bei gleichbleibender Erythrozytenzahl auch erhöhen. Deshalb war es notwendig, auch die Bestimmung des Hämoglobins in die Untersuchung mit einzubeziehen. Über die möglicherweise vorhandene Einwirkung und Schädigung des Hämoglobins durch Ozon liegen ebenfalls kaum Arbeiten vor. CARLSON und JORDAN (1913) kamen zu dem Ergebnis, daß der Effekt von Ozon auf den Veränderungen der respiratorischen Membranen und der Stimulation von Nervenendigungen beruht, nicht aber auf einer Veränderung des Blutfarbstoffes. An ihren Versuchstieren konnten sie zudem nie die Anzeichen einer Asphyxie feststellen. SCHALM (1961) konnte bei einer Konzentration von  $2,4 \text{ mg Ozon/m}^3$  Luft eine Verschiebung des Hämoglobingehaltes bei überlebenden Meerschweinchen registrieren. Er führte diese Veränderungen ebenfalls nicht auf einen direkten Einfluß des Ozons zurück, sondern glaubte, daß es sich hier um sekundäre Hämoglobin-Konzentrations-Veränderungen handelt, die bedingt sind durch Veränderungen im Wassergleichgewicht. Sehen wir uns auf Abb.13 die Hämoglobinwerte der ozonbehandelten Versuchsfische an, so ist auch bei diesen Werten eine Übereinstimmung im Verlauf mit den Erythrozyten- und Leukozytenwerten festzustellen. Ein Maximum von  $11,0 \text{ g\%}$  ist bei der Gruppe I (2 Stunden) vorhanden. In der Zeit von 1 bis zu 4 Stunden befinden sich die Hämoglobinwerte über dem Normalwert. Danach

sinkt das Hämoglobin ab, um den tiefsten Stand in der Gruppe III (5,5 Stunden) zu erreichen. Zwischen den Zeiten von 4,25 und 7,5 Stunden liegt der Hämoglobingehalt des Blutes der Versuchsfische unter dem ermittelten Normalwert von 10,0 g%. Parallel zu den Erythrozyten erfolgt dann in den Gruppen IV und V ein Anstieg des Hämoglobingehaltes im Blut, der ab dem Zeitpunkt 7,5 Stunden wieder höher liegt als 10,0 g%.

Vergleicht man den Mittelwert des Hämoglobingehaltes der Kontrollfische von 10,0 g% mit dem der Versuchsfische von 9,95 g%, so ist kaum ein Unterschied zu bemerken.

### Hämoglobinwerte in g % der Versuchsfische

| Versuchsdauer<br>in Stunden | Hämoglobinwerte<br>in g % | O <sub>3</sub> -Gehalt des<br>Wassers in mg/l | Temperatur<br>des Wassers |
|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------|
| Gruppe I: 2h                | 11,0                      | 0,024                                         | 8° C                      |
| " II: 3,5h                  | 10,3                      | 0,024                                         | 8° C                      |
| " III: 5,5h                 | 9,34                      | 0,025                                         | 8° C                      |
| " IV: 7,5h                  | 9,95                      | 0,024                                         | 8,2° C                    |
| " V: -24h                   | 10,5                      | 0,024                                         | 8° C                      |

### Statistische Berechnung der Mittelwerte des Hämoglobins

#### a) Kontrollfische

$$M_1 = 10,0$$

$$f_1 = 41$$

$$2$$

$$s_1 = 3,417$$

#### b) Versuchsfische

$$M_2 = 9,95$$

$$f_2 = 27$$

$$2$$

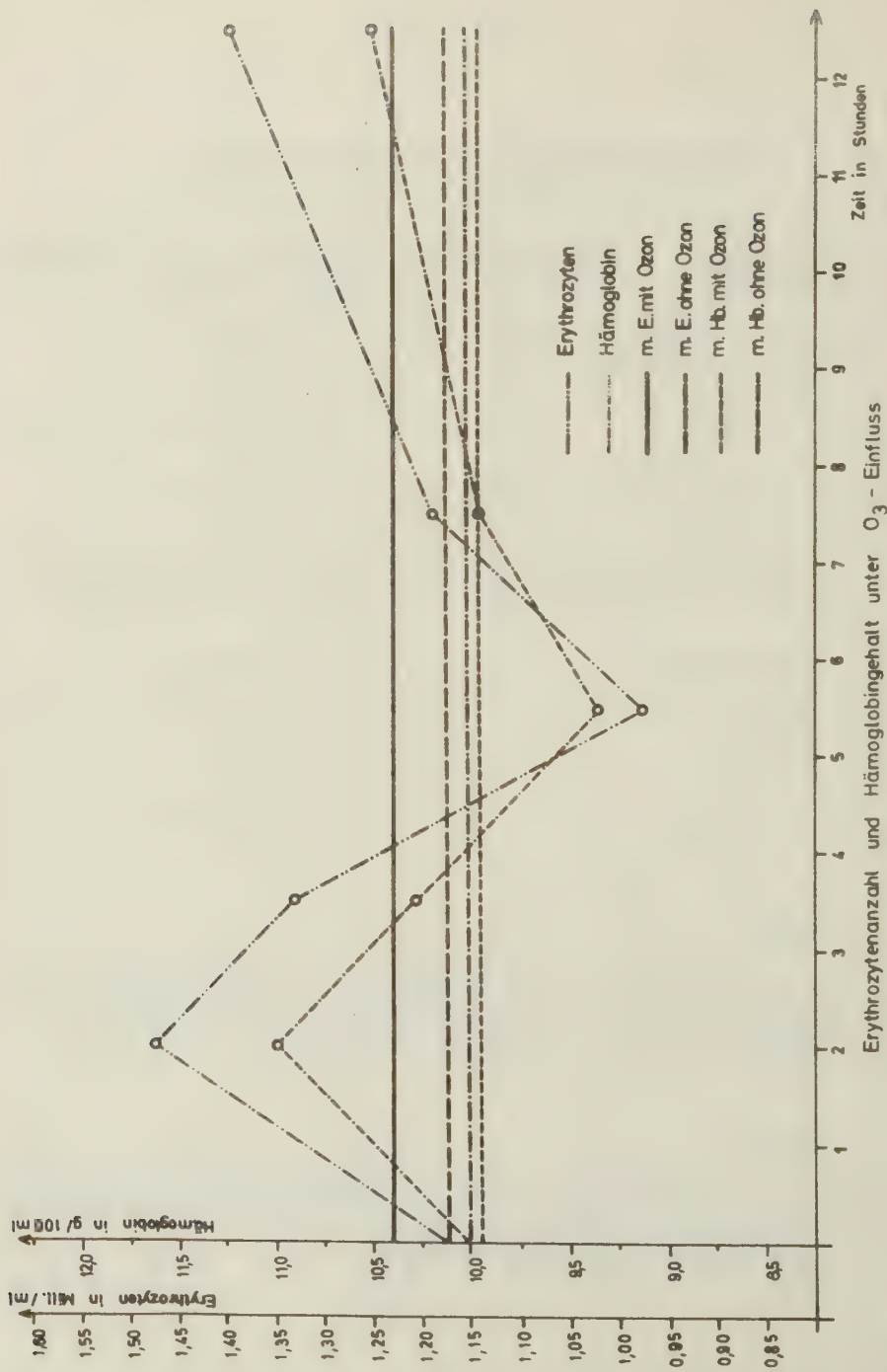
$$s_2 = 4,06$$

#### F-Test:

Bei einem F-Wert von 1,19 ergibt sich bei einer 1%igen Irrtumswahrscheinlichkeit für die Varianzen ein Tabellenwert für die F-Verteilung von:  $F_{TAB} = 2,26$ . Signifikanz liegt nicht vor.

#### t-Test:

Aus  $t = 0,29$  und  $t_{TAB} = 2,65$  bei einer 1%igen Irrtumswahrscheinlichkeit folgt, daß ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten nicht besteht.



#### d) Der Blutzucker

Das Blut behält im normalen Organismus seinen Zucker-gehalt auf jeden Fall aufrecht. Wie aus den vorher zitierten Arbeiten zu ersehen ist, gibt es unter normalen Verhältnissen Belastungen, die beim Fisch eine Änderung der Blutzuckerwerte nach oben oder unten hervorrufen können. Für die Regulierung des notwendigen Blutzuckers im Blut sorgen die auch beim Fisch vorhandenen Hormone. Beim Fisch konnte bisher eindeutig nachgewiesen werden, daß bei starkem Sauerstoffmangel eine Erhöhung des Blutzuckers erfolgt. Diese Tatsache veranlaßte mich dazu, nach quantitativen Veränderungen des Blutzuckers nach Ozoneinwirkung zu suchen. In der Literatur ist darüber bisher nichts veröffentlicht worden. JONES, JENKINS, COON und SIEGEL (1970) untersuchten zwar die biochemischen Veränderungen durch Ozon einfluß, dehnten diese Untersuchungen aber nicht auf den Blutzucker aus.

Bei meinen Blutzuckeruntersuchungen mußte ich mich auf einen Normalwert der Kontrollfische beziehen, der, verglichen mit anderen Untersuchungen, recht hoch war. Die Blutzuckerwerte der einzelnen Gruppen erreichten nie den Normalwert (siehe Abb.14). Die Gruppe I, die das Ende der Manifestationsphase nach einer Stunde erreicht hatte, zeigte den niedrigsten Wert von 34,0 mg/100 ml an. Das bedeutet einen starken Abfall des Blutzuckers kurz nach Versuchsbeginn. Die Gruppe II, mit einer Versuchsdauer von 3 Stunden und einem Blutzuckerwert von 52,3 mg, besitzt schon einen wesentlich höheren Blutzuckerwert

als die Gruppe I. Den höchsten Wert erreichte die Gruppe IV nach einer Zeit von 4,5 Stunden und einem Blutzuckerwert von 70,2 mg. Sehen wir uns die Gruppe V an, mit einer Versuchsdauer von 6,5 Stunden und einem Blutzuckerwert von 52,6 mg, so ist bereits wieder ein Abfall zu registrieren, der sich auch in der Gruppe V bis zu 24 Stunden manifestiert.

Der höchste Blutzuckerwert der Versuchstiere fällt mit der größten Sterbequote der Forellen zusammen. Vergleicht man nun den Mittelwert der Kontrollfische von 98,7 mg/100 ml Blut und der Versuchsfische von 49,07 mg, so ist bei den ozonisierten Fischen ein starker Abfall (50 %) der Blutzuckerwerte festzustellen.

Blutzuckerwerte in mg/100 ml Blut der Versuchsfische

| Versuchsdauer<br>in Stunden | Blutzuckerwerte<br>in mg/100 ml | O <sub>3</sub> -Gehalt des<br>Wassers in mg/l | Temperatur<br>des Wassers |
|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------|
| Gruppe I: 1h                | 34,0                            | 0,024                                         | 8° C                      |
| " II: 3h                    | 52,3                            | 0,024                                         | 8° C                      |
| " III: 4,5h                 | 70,2                            | 0,025                                         | 8° C                      |
| " IV: 6,5h                  | 52,6                            | 0,024                                         | 8,2° C                    |
| " V: -24h                   | 47,3                            | 0,024                                         | 8° C                      |

Statistische Berechnung der Mittelwerte des Blutzuckers

a) Kontrollfische

$$M_1 = 98,7 \text{ mg/100 ml}$$

$$f_1 = 34$$

$$2$$

$$s_1 = 890.55$$

b) Versuchsfische

$$M_2 = 49,07 \text{ mg/100 ml}$$

$$f_2 = 27$$

$$2$$

$$s_2 = 1.113.33$$

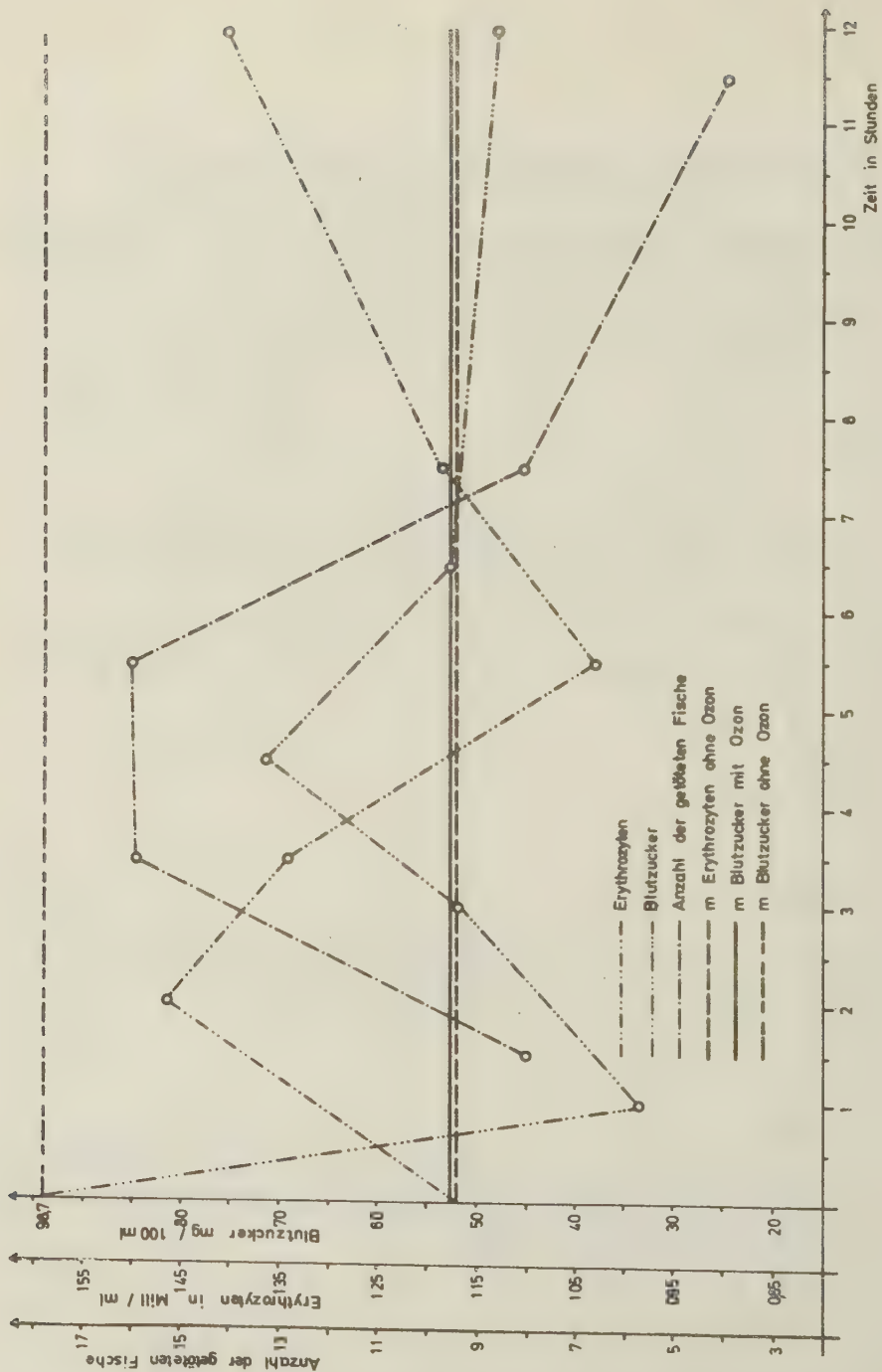
F-Test:

Bei 1% Irrtumswahrscheinlichkeit ergibt sich für die Varianzen ein F-Wert von 1,25. Der Tabellenwert für die F-Verteilung:

$F_{TAB} = 2,35$ . Signifikanz liegt nicht vor.

t-Test:

Aus  $t = 4,26$  und  $t_{TAB} = 2,66$  bei einer 1%igen Irrtumswahrscheinlichkeit folgt, daß ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten vorliegt.



#### e) Das Gesamteiweiß

In der Human- und Veterinärmedizin haben die Bestimmungen der Gesamteiweißwerte von Patienten schon lange eine große Bedeutung erlangt, da sie ein wertvolles Hilfsmittel zur Diagnose von Krankheiten darstellen. In neuerer Zeit wurden zahlreiche Untersuchungen an Fischen durchgeführt, und man kam zu dem Ergebnis, daß die Veränderungen der Gesamteiweißwerte in vielen Dingen den schon bekannten Ergebnissen aus der Medizin entsprechen. Im Hinblick auf die Ozonversuche mit Fischen ist dies eine nicht außer Acht zu lassende Tatsache. In der Literatur fanden sich nur Angaben über die Veränderungen der Gesamteiweißwerte bei kleinen Säugern nach Ozonbehandlung. So konnte STOKINGER (1962) in Tierversuchen nachweisen, daß die Inhalation von  $O_3$  zum Auftreten von Antikörpern (Präzipitintest) führt. STOKINGER führt diese Antikörperbildung auf die eiweißdenaturierende Eigenschaft des Ozons zurück. Daß zum Teil auch eine echte Sensibilisierung vorliegen kann, wollte STOKINGER nicht ausschließen. SACHSENMAIER (1966), der die Wirkung des Ozons auf Proteine und Nucleinsäuren untersuchte, kam zu dem Ergebnis, daß sowohl die Nucleinsäuren als auch die Proteine depolymerisiert werden.

Die Gesamteiweißwerte der mit Ozon behandelten Fische sind in Abbildung 15 dargestellt. Das Gesamteiweiß der Gruppe I, also nach 2 Stunden, liegt mit 3,59 g/100 ml über dem Normalwert. Hier ist ein Anstieg, ebenso wie bei den Blutkörperchen, zu

verzeichnen. Während die Blutkörperchenwerte der Gruppe II nach 3,5 Stunden schon erheblich niedriger liegen als die der Gruppe I, steigt im Gegensatz dazu der Gesamteiweißwert weiter an und erreicht nach 3,5 Stunden für die Gruppe II ein Maximum. Verbindet man jetzt den Wert der Gruppe II von 3,9 g/100 ml mit dem Wert der Gruppe III von 3,08 g/100 ml, so ist ein starker Abfall zu verzeichnen. Der nun folgende Wert der Gruppe IV (4,5 Stunden) mit 2,87 g und der Gruppe V (- 24 Stunden) mit 3,08 g/100 ml liegen alle unter dem Normalwert. Der Wert der Gruppe V läßt dabei schon eine geringe Erhöhung erkennen. Bis zu dem Zeitpunkt von 4,75 Stunden liegen die Gesamteiweißwerte über dem Gesamteiweiß-Mittelwert der Kontrolltiere. Dagegen liegen die Gruppen III, IV und V mit ihren Werten unter dem Normalwert, der auch nach der längsten Versuchsdauer nicht mehr erreicht wird. Wird der Gesamteiweißgehalt der Kontrollfische von 3,37 g/100 ml Blut mit dem der Versuchsfische von 3,44 g verglichen, so ist nur eine geringe Differenz zwischen den Werten festzustellen.

Anders sieht es dagegen mit den Albuminwerten aus. Während bei den Kontrollfischen ein Albuminanteil von 2,39 g vorlag, und sich so aus der Differenz zwischen Gesamteiweiß von 3,37 g und Albuminanteil von 2,39 g ein Globulinwert von 0,98 g errechnete, lagen die Verhältnisse bei den Versuchsfischen wesentlich anders (siehe Abb.15). Bei einem Gesamteiweißgehalt von 3,44 g und einem Albuminanteil von 1,93 g errechnete sich für die Versuchsfische ein

Globulinwert von 1,63 g/100 ml. Zeigt der Vergleich der Gesamteiweißwerte der Versuchs- und Kontrollfische kaum eine Veränderung, so findet eine große Wertverschiebung im Albumin-Globulin-Bereich statt. Die Versuchsfische haben also bei etwa normalem Gesamteiweißwert einen geringeren Albuminanteil. Das bedeutet, daß bei den Versuchsfischen eine Erhöhung des Globulinanteils stattgefunden hat. Der Albumin-Globulin-Quotient beträgt bei den Versuchsfischen 1,18.

Gesamteiweißwerte in g/100 ml Blut der Versuchsfische

| Versuchsdauer<br>in Stunden | Gesamteiweißwerte<br>in g/100 ml | O <sub>3</sub> -Gehalt des<br>Wassers in mg/l | Temperatur<br>des Wassers |
|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------|
| Gruppe I: 2h                | 3,59                             | 0,024                                         | 8° C                      |
| " II: 3,5h                  | 3,90                             | 0,024                                         | 8° C                      |
| " III: 5,5h                 | 3,08                             | 0,025                                         | 8° C                      |
| " IV: 7,5h                  | 2,87                             | 0,024                                         | 8,2° C                    |
| " V: -24h                   | 3,08                             | 0,024                                         | 8° C                      |

Statistische Berechnung der Mittelwerte des Gesamteiweißes

a) Kontrollfische

$$M_1 = 3,37$$

$$f_1 = 18$$

2

$$s_1 = 0,38$$

b) Versuchsfische

$$M_2 = 3,44$$

$$f_2 = 16$$

2

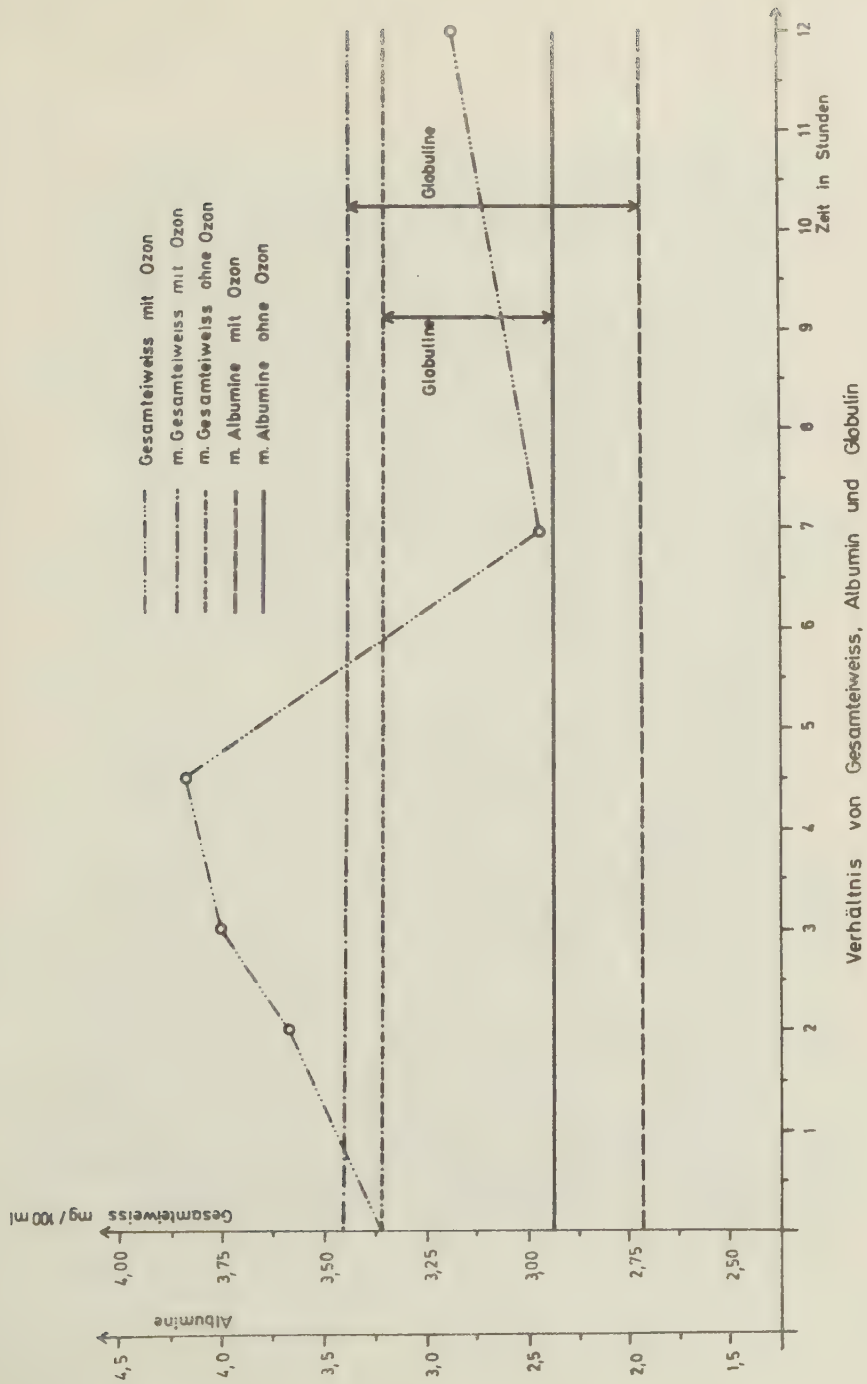
$$s_2 = 0,68$$

F-Test:

Bei 1% Irrtumswahrscheinlichkeit ergibt sich für die Varianzen ein F-Wert von 1,78. Der Tabellenwert für die F-Verteilung:  $F_{TAB} = 3,20$ . Signifikanz liegt nicht vor.

t-Test:

Aus  $t = 0,194$  und  $t_{TAB} = 2,73$  bei einer 1%igen Irrtumswahrscheinlichkeit folgt, daß ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten nicht besteht.



#### f) Die Elektrophorese

Während bei der Gesamteiweißbestimmung alle vorhandenen Serumproteine quantitativ erfaßt werden, kann mit Hilfe der Elektrophorese, abhängig von ihrer Art, sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Aufschlüsselung der Proteinfractionen vorgenommen werden. Das Schwergewicht der elektrophoretischen Untersuchungen liegt bei der Disc-Elektrophorese nicht auf dem quantitativen Gebiet, so daß die Gesamteiweißbestimmung mittels der Biuret-Methode ihre Berechtigung hat. Elektrophoretische Untersuchungen der Serumproteine von Fischen sind bisher im Zusammenhang mit dem Einfluß verschiedener toxischer Stoffe auf den Fisch gemacht worden.

Betrachtet man die Abbildung 16, so kann man in dem Pherogramm eines unbehandelten Fisches alle Albumin- und Postalbuminfraktionen feststellen. Es sind dies die Albuminfraktionen Nr. 102,1 und 100 und die davor liegenden Postalbumine mit der Nr. 96,4 und 93,6. Die Transferrine, die vor den Albuminen liegen, haben hier die R-Werte 79,5 und 74,3. Die  $\gamma$ -Globuline, die aufgrund ihres Molekulargewichtes in der Elektrophorese am langsamsten wandern, liegen in der Nähe des Startes mit den R-Werten 5,26 und 8,95. In dem nach dem Pherogramm angefertigten Diagramm sind diese Werte noch einmal wiedergegeben und die jeweilige Stärke des Striches sagt etwas über die Quantität der einzelnen Serumproteine aus. Vergleichen wir dieses normale

Diagramm oder das Pherogramm mit denen, die von den Versuchsfischen herrühren, so fallen vor allen Dingen die Veränderungen im Albumin- und im Globulinbereich auf. Bei der Gruppe I, also nach einer Versuchsdauer von 2 Stunden, verschwindet die Albuminfraktion mit dem R-Wert 102 und die zweite Postalbuminfraktion mit dem R-Wert 98,2 bildet sich zurück (siehe Abb.17). Im  $\beta$ -Globulinbereich treten zwei neue Peaks auf mit den Werten 82,0 und 85,5. Um welche Eiweiße es sich hier genau handelt, vermag ich nicht anzugeben. Im übrigen Globulinbereich ist sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Zunahme festzustellen. Bei den  $\gamma$ -Globulinen sind jetzt 3 Peaks zu unterscheiden. Die Veränderungen nehmen nach 3 Stunden noch zu, wie aus der Abbildung 18 zu ersehen ist. Das Mengenverhältnis der Albumine zu den Globulinen verändert sich stark bei Beibehaltung der einzelnen Albuminfraktionen. Dagegen gibt es bei den  $\beta$ -Globulinen untereinander eine Verschiebung. Den höchsten Peak stellt jetzt die Fraktion mit dem R-Wert 74,8 dar. Außerdem kommt es zur Bildung einer neuen Fraktion (R-Wert 76,0). Die Veränderungen im übrigen Globulinbereich äußern sich weiterhin in einer Zunahme.

Die Abbildung 19 zeigt das Pherogramm und Diagramm einer Gruppe von Fischen, die nach 7 Stunden (Gruppe IV) untersucht wurden. Hier zeigt sich eine sehr starke Veränderung des gesamten Proteingefüges. Betrachten wir zuerst die Albumine, so ist ein weiterer Schwund dieser Fraktionen zu bemerken.

Innerhalb der Postalbumine und Albumine kommt es ebenfalls zu einer Verschiebung. Auch im  $\beta$ -Globulinbereich zeichnet sich eine Verringerung der Fraktionen ab. Die vorher noch starke Fraktion mit dem R-Wert 74,8 verschwindet vollständig und nur die 80er Werte bleiben in etwa erhalten. Überhaupt scheint eine Verlagerung innerhalb der Globuline stattgefunden zu haben. Den Hauptanteil nimmt jetzt der Bereich der am Start liegenden Globuline ein. Hierbei dürfte es sich wohl hauptsächlich um  $\gamma$ -Globuline handeln. In diesem Stadium kann man feststellen, daß eine weitere Abnahme der Albumine erfolgt ist und innerhalb der Globuline eine Verlagerung zu den  $\gamma$ -Globulinen stattgefunden hat.

Das nächste Pherogramm, Abb.20, zeigt das Serumbild der Fische, die über 20 Stunden im Versuch gestanden haben. Es sieht so aus, als ob eine Normalisierung erfolgt wäre. Die erhaltenen Pherogramme der Tiere, die über 20 Stunden der Ozonisierung ausgesetzt waren, scheinen insgesamt auf eine allgemeine Verringerung der Serumproteine hinzudeuten, wenn auch die Albuminfraktionen eine Zunahme gegenüber der Gruppe IV zu verzeichnen haben.

Zusammenfassend kann folgendes festgestellt werden: Am Anfang der Ozonisierung findet eine Rückbildung der Albumine zugunsten der Globuline statt. Mit zunehmender Dauer der Ozonisierung scheint es große Verschiebungen innerhalb der Globuline zu geben. Der Höhepunkt der Verschiebung scheint nach 7 Stunden erreicht zu sein und äußert sich in einer starken Zunahme im  $\gamma$ -Globulinbereich. Bei zunehmender Versuchsdauer scheint es allmählich zu einer Kompensierung der einzelnen Fraktionen zu kommen, die aber nicht mehr ihre alte Höhe erreichen.

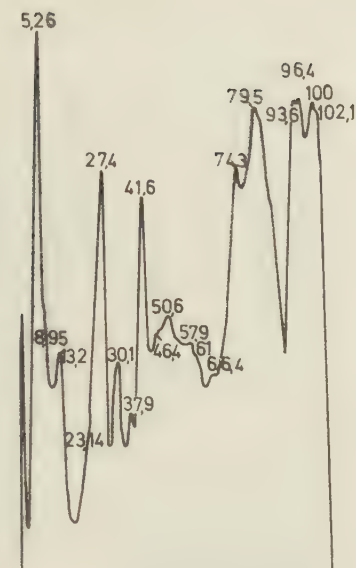
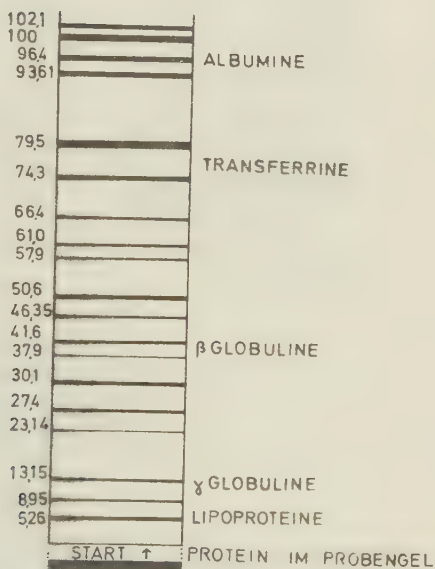


Abb.16: Pherogramm und Diagramm eines normalen Forellenserums.

Albumine mit den R-Werten: 102,1; 100 96,4  
 Postalbumine mit den R-Werten: 96,4; 93,6



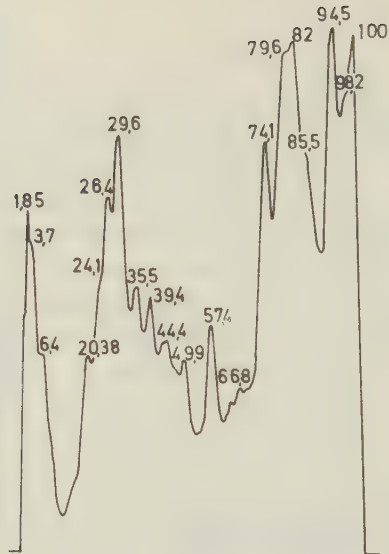
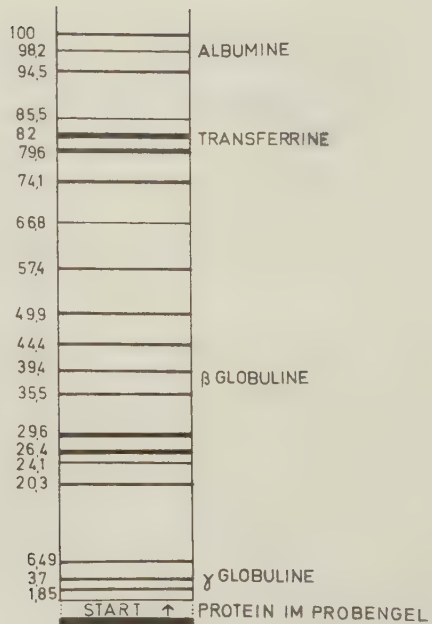


Abb.17: Serumpherogramm und Diagramm einer 2 Stunden lang ozonisierten Forelle.

Verlust oder Abnahme der Fraktionen mit den R-Werten: 102;98. Zunahme der Fraktionen mit den R-Werten: 85;82; 3,7;1,85 und im übrigen Globulinbereich



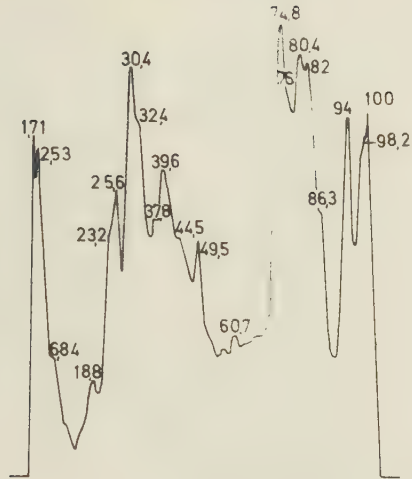
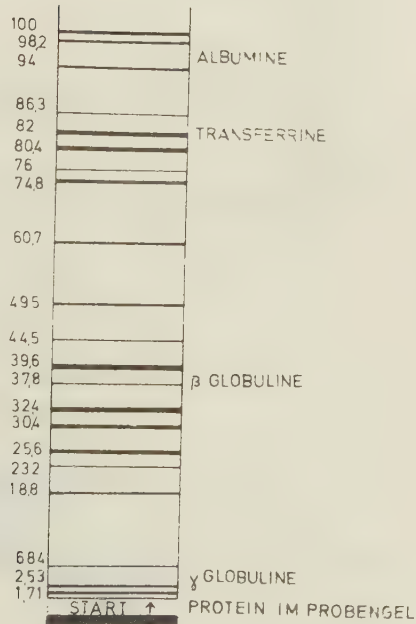


Abb.18: Serumpherogramm und Diagramm einer 3 Stunden lang ozonisierten Forelle.

Verlust oder Abnahme der Fraktionen mit den R-Werten: 102;100 98,2;94.  
Zunahme der Fraktionen mit den R-Werten: 76;74,8 und im übrigen Globulinbereich



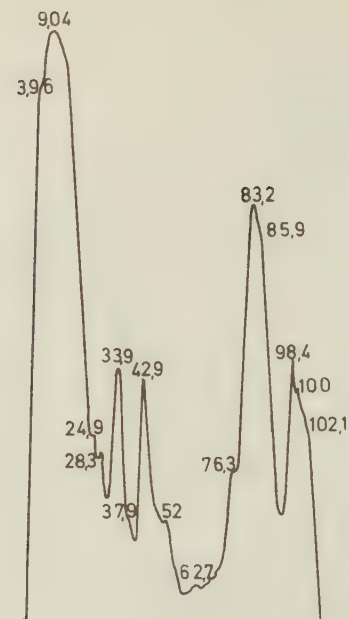
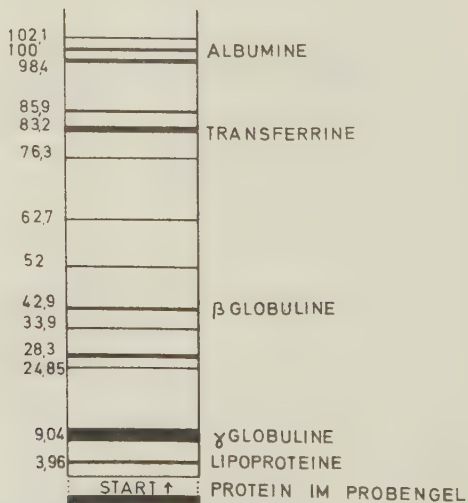


Abb.19: Serumpherogramm und Diagramm einer 7 Stunden lang ozonisierten Forelle.

Verlust oder Abnahme der Fraktionen mit den R-Werten: 102,1; 100; 94.

Zunahme der Fraktionen im  $\gamma$ -Globulinbereich



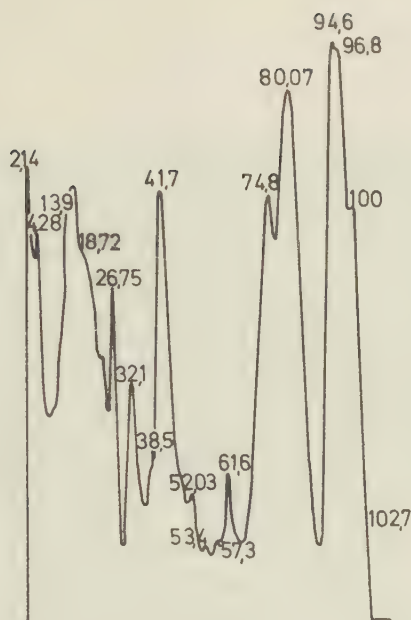
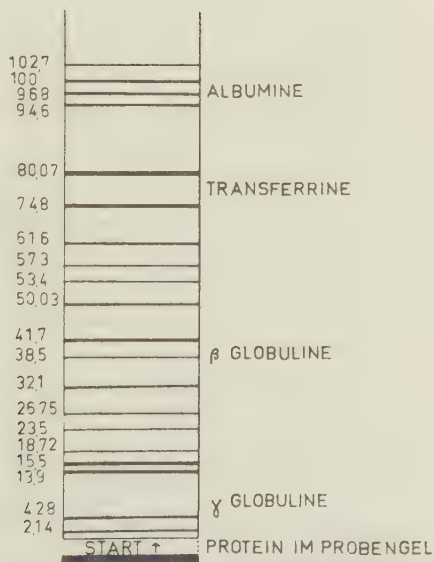


Abb.20: Serumpherogramm und Diagramm einer 21 Stunden lang ozonisierten Forelle.

Abnahme der Fraktionen mit den R-Werten: 102,7; 100. Normalisierung im Globulinbereich



## D. Pathologisch-histologische Untersuchungen einzelner Organe

### I. Kiemen

#### 1. Anatomie der Kiemen

Wird ein Kiemenbogen quergeschnitten, so sind die Einzelheiten gut zu erkennen (Abb.21). Die Kiemenblätter liegen in zwei Reihen angeordnet am äußeren Rand der Kiemenbögen. Auf den Kiemenblättern befinden sich sehr dünne respiratorische Fältchen, die zum Ende des Blattes hin verschwinden. Diese Kiemenlamellen bestehen aus einer Verdoppelung des Kiemenepithels. An der Basis der einzelnen Kiemenlamellen geht das einschichtige Epithel in ein mehrschichtiges über. Am Ende der Lamellen sitzen auf beide Seiten verteilt azidophile Zellen, die auch als chlorid-sezernierende Zellen bezeichnet werden. Über die Funktion dieser Zellen ist man sich noch nicht schlüssig; HARDER (1964). Es besteht nach BEVERLANDER (1935) aber die Möglichkeit, daß das gesamte Epithel der Lamellen die Fähigkeit besitzt, über die Ausscheidung von Chloriden den osmotischen Druck der Körperflüssigkeiten zu regulieren. Die Pfeilerzellen zwischen den beiden Kiemenepithelien geben den Lamellen Halt und halten sie offen. Die Pfeilerzellen begrenzen die Kapillaren oder Sinusoide der Lamellen. Durch diese Aufteilung ergibt sich eine große respiratorische Fläche. Die Kiemenblätter sind von einem Knorpelstrahl gestützt. An der Basis des jeweiligen Knorpelstrahls befindet sich der Ansatz eines quergestreiften Muskels, der zum gegenüberliegenden Strahl verläuft. Die Muskeln beider Blättchenreihen

überkreuzen sich, so daß eine Stellungsregulierung der Blättchen zueinander möglich ist. Zwischen diesen Muskeln liegt die Kiemenarterie. Diese Arterie gibt in jedes Blättchen ein Blutgefäß ab, das sich dann in ein Kapillarnetz aufteilt. Aus diesem Kapillarnetz geht die Kiemenblättchenvene hervor, die sich später zu einer Hauptvene vereinigt und in der Rinne des knöchernen Kiemenbogens verläuft. Die Reusenfortsätze, die am Kiemenbogen sitzen, sind mit Kiemenbogenschleimhaut überzogen, in der auch Sinneszellen zu finden sind.

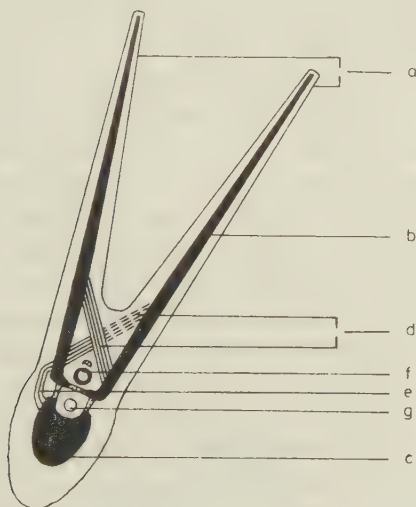


Abb.21: Querschnitt durch die Holobranchie eines Teleostiers in Abduktionsstellung (nach HARDER, 1964); a Kiemenblatt; b Kiemengräte; c Kiemenbogen; d Adduktormuskeln; e Abduktormuskeln; f A.branch.afferens; g A.branch.efferens

## 2. Histologische Kiemenuntersuchungen an Versuchs- und Kontrollfischen

Die Fische wurden alle einem Ozongehalt des Wassers von 0,024 mg/l ausgesetzt. Entscheidend für den Abschluß der einzelnen Versuche war der Beginn der irreversiblen Schädigungen. Hatte der Fisch dieses Stadium erreicht, wurde die makroskopische und histologische Untersuchung vorgenommen. Durch die unterschiedliche Resistenz der Fische gegenüber Ozoneinfluß war es mir möglich, die histologischen Kiemenuntersuchungen von 1 bis zu 24 Stunden durchzuführen.

Am augenscheinlichsten waren die Veränderungen an den Kiemenlamellen. Epithelhyperplasien traten am einschichtigen Epithel der Lamellen und am mehrschichtigen Epithel zwischen den einzelnen Kiemenlamellen auf. Am auffallendsten waren in einem frühen Versuchsstadium die Hyperplasien der Lamellenspitzen und starke Blutfüllung der Kapillaren. Diese Art der Veränderung trat bei sehr früh die Letalitätsphase erreichten Fischen auf, war aber auch bei länger am Leben gebliebenen Tieren noch festzustellen (1 bis 3 Stunden). Neben diesen geschilderten Veränderungen traten bei den früh ausgefallenen Fischen irreversible Schädigungen des Kiemenepithels auf.

Die histologische Untersuchung des Kiemenepithels der ab 3,5 Stunden aufwärts den Versuch beendeten Fischen, zeigte die Ablösung ganzer Epithelzellverbände. Dabei kann man nekrobiotische Vorgänge

in den betroffenen Zellen beobachten. Außerdem kommt es zu Spaltbildungen in den Epithelszellen, die zum Teil mit Flüssigkeit angefüllt sind, so daß sich die Epithelien von den Endothelzellen der Sinusoide abhoben und abstarben. Am Zytoplasma und an den Zellkernen konnten ebenfalls Schädigungen nachgewiesen werden. Man kann dann keine einzelnen Lamellen mehr unterscheiden, da es durch die allmähliche Auflösung der Strukturformen wie ein einheitliches Ganzes aussieht. Auffallend ist nur weiterhin der durch die Pfeilerzellen gebildete Mittelstrang. Die Sinusoide wurden dabei durchlässig für das Blut, da der Schutz der Epithelzellen verloren gegangen war und die Schädigung der Wände der Sinusoide durch Ozon schnell einsetzte. Im histologischen Bild waren deshalb eine Menge Blutkörperchen zwischen den einzelnen Lamellen festzustellen. Daneben fielen auch noch intakte Sinusoide auf, die aber stark erweitert und voller Blutkörperchen waren. Quellungen im Bereich des Kiemenstrahls und eine allgemeine Verkürzung der Kiemenblätter waren ebenfalls auf die Einwirkung von Ozon zurückzuführen. Die Verkürzung der Kiemenblätter war die Folge der Nekrose der Kiemenblätterspitzen. Mit entscheidend für diese Spitzennekrose dürfte neben der direkten Einwirkung des Ozons auch die schlechte Blutversorgung der Spitzen sein, bedingt durch die Schädigung der Kapillaren und dem damit verbundenen Blutverlust. In den Spitzen der Kiemenblätter fiel auch eine große Menge kleiner roter Punkte auf, die wohl die Reste zerfallener Zellen darstellten.

Zur Abhängigkeit zwischen der Dauer der Ozonbehandlung und der Schwere der Schädigungen wäre noch folgendes zu sagen: Entscheidend scheint die individuelle Resistenz gegenüber dem Ozon zu sein, denn sonst wäre eine Manifestationsphasenbreite, die von 1 Stunde bis zu 24 Stunden reicht, nicht zu erklären. Insofern sind die Schädigungen der Kiemen zeitlich nicht genau festzulegen. Da die meisten Tiere aber zwischen einer Versuchsdauer von 3,5 und 5,5 Stunden die irreversiblen Gleichgewichtsstörungen erreicht hatten und die oben beschriebenen Kiemenschädigungen aufwiesen, kann man bei der vorgelegenen Konzentration von 0,024 mg Ozon/l Wasser diesen Zeitpunkt als Kriterium festlegen. Die Kiemen der Kontrollfische waren ohne Veränderungen.

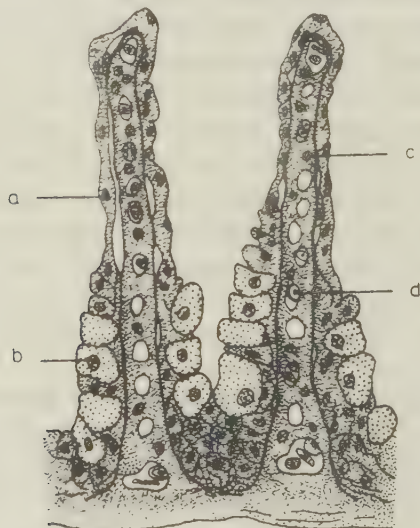


Abb.22: Kiemenlamellen (nach HARDER, 1964);  
a Epithelzelle; b azidophile Zelle;  
c Pfeilerzelle; d Blutkapillare

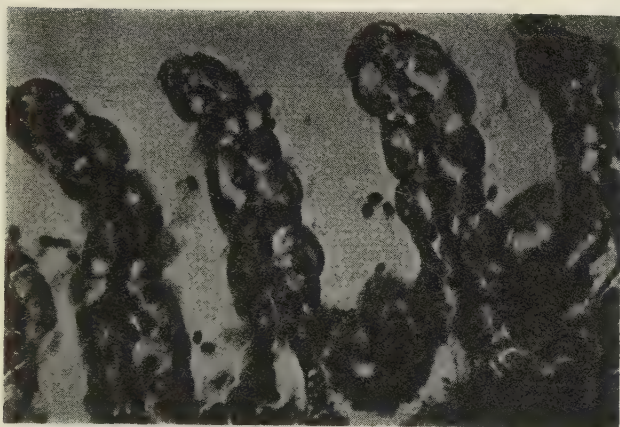


Abb.23: Kiemenlamellen einer gesunden Regenbogenforelle (H.-E.-Färbung)

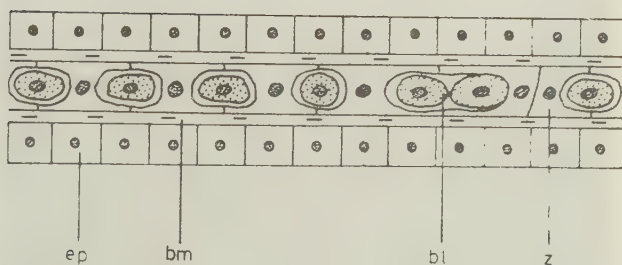


Abb.24: Querschnitt durch eine Kiemenlamelle (nach WUNDER, 1936); bl Blutkörperchen; ep Epithelzelle; bm Bindegewebsmembran; z Palisadenzelle

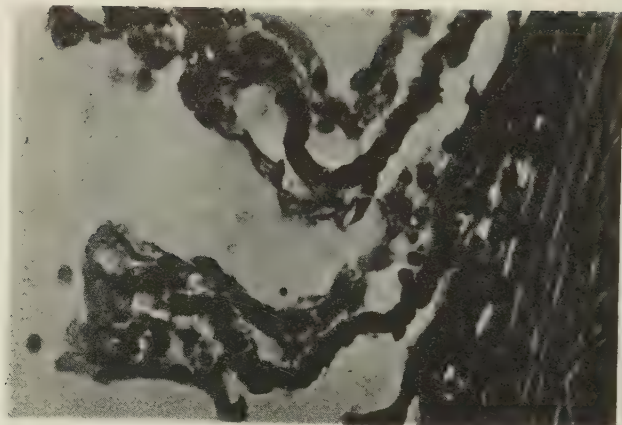


Abb.25: Mittlere Kiemenlamellenschäden  
nach Einwirkung von 0,024 mg  
Ozon/l Wasser (H.-E.-Färbg.)

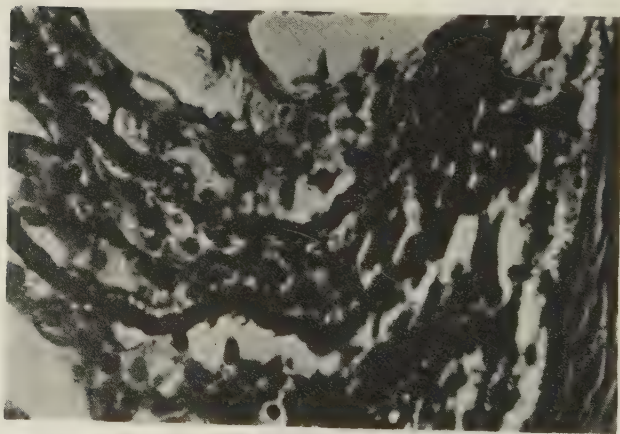


Abb.26: Schwere Kiemenlamellenschäden  
nach Einwirkung von 0,024 mg  
Ozon/l Wasser (H.-E.-Färbg.)

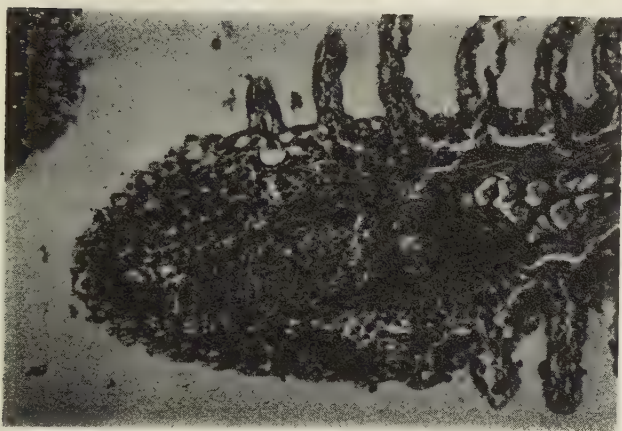


Abb.27: Kiemenblättchenspitze einer gesunden Regenbogenforelle (H.-E.-Färbg.)

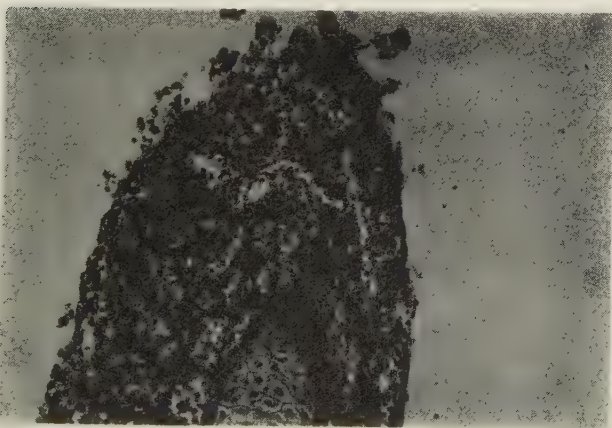


Abb.28: Kiemenblättchenspitze einer mit 0,024 mg Ozon/l Wasser behandelten Regenbogenforelle (H.-E.-Färbung)



Abb.29: Die Kiemenblättchen einer gesunden Regenbogenforelle (H.-E.-Färbg.)

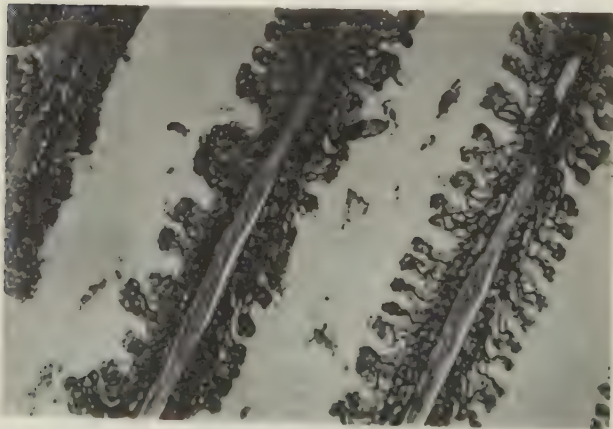


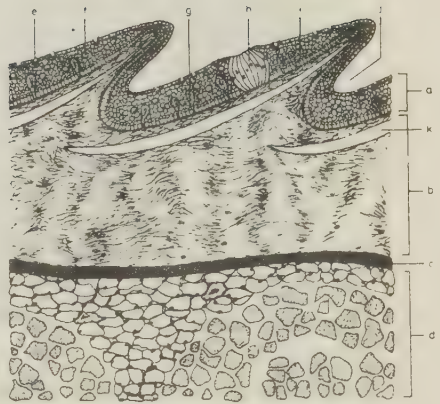
Abb.30: Die Kiemenblättchen einer mit 0,024 mg Ozon/l Wasser behandelten Regenbogenforelle (H.-E.-Färbg.)

## II. Haut

### 1. Anatomie der Haut

Die Haut der Fische besteht wie die Haut aller Wirbeltiere aus zwei großen Schichten. Nach außen hin haben wir die Epidermis, die aus einem vielschichtigen Epithel besteht. Darunter liegt die stark entwickelte Cutis, aus der auch die Schuppen der Fische hervorgehen. Die Epidermis besteht vollständig aus lebenden Zellen, die man in eine Schleimschicht und eine Basalschicht unterteilen kann. In der Schleimschicht finden wir Kolbenzellen, seröse Zellen und die Epithelzellen. Die Basalschicht besteht aus zylindrischen Zellen. Daran schließt sich die Cutis an. Das lockere Bindegewebe (Stratum laxum) und das straffe Bindegewebe (Stratum compactum) bilden insgesamt die Cutis. Neben den Blutgefäßen, Nerven und Pigmentzellen enthält die Cutis bei den Fischen auch die Schuppen. Die Epidermis wird von den Schuppen dachziegelartig hochgewölbt. Außerdem kann der Fisch mit den in der Cutis vorhandenen Pigmentzellen seine Farbe verändern. Dies ist möglich durch die Veränderung der Lage des Pigments.

Abb. 31: Schnitt durch die Haut einer Forelle (nach WUNDER, 1936);  
a Epidermis;  
b Cutis; c Pigment-  
schicht; d Subcutis  
und Muskelfasern;  
f Körnerzellen;  
g Kolbenzellen;  
h Sinnesknospe;  
i Basalzellen;  
j Schuppentasche;  
k Schuppe



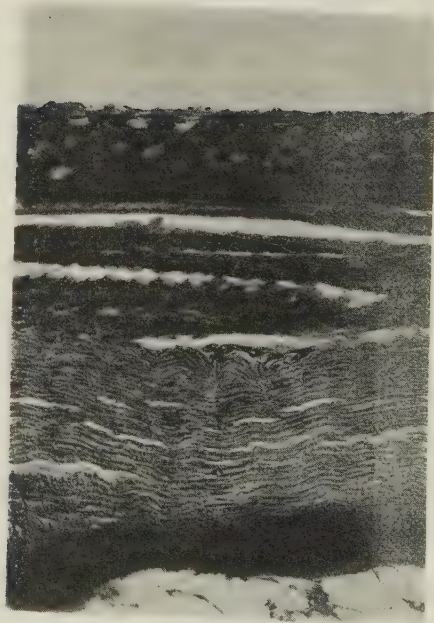
## 2. Histologische Hautuntersuchungen an Versuchs- und Kontrollfischen

Für die histologischen Hautuntersuchungen benutzte ich ein seitlich der Rückenflosse und caudal der Brustflossen entnommenes  $1 \text{ cm}^2$  großes Hautstück. Bei den Kontrollfischen wurden die Hautstücke an der gleichen Stelle entnommen. Die histologischen Schnitte von den Kontrollfischen zeigten keinerlei Veränderungen. Die ersten Veränderungen des Epithels der Versuchsfische zeigt sich darin, daß die tiefer liegenden Kolbenzellen vergrößert waren, während

die weiter außen liegenden Kolbenzellen schon Schädigungen der Kerne (Pyknose) zeigten und zum Teil bildeten die Zellen leere Räume. Diese degenerativen Kernveränderungen beruhen auf einem Zusammenbacken des Chromatins und Austreten von Kernsaft. Histologisch erscheinen sie dann als unregelmäßig geformte und stark anfärbbare Kerne. Das Erscheinen dieser Kernformen deutet auf ein intravitales Zellsterben hin. An den äußeren Epithelzellen waren in diesem Stadium ebenfalls schon Zerfallserscheinungen festzustellen. Bei längerer Einwirkung von Ozon trat Nekrose auf, was durch die abgelösten Zellen und die Kernveränderungen deutlich wurde. Die Veränderungen können bis in die tiefere Schicht der Basalzellen übergreifen. Das nekrotische Gewebe war durchsetzt von Kerntrümmern und Pigmentschollen. Die nekrotischen Prozesse können so tiefgreifend sein, daß es zu einer vollständigen Ablösung der Schleimschicht kommen kann, so daß die oberste Schicht dann die Cutis ist. In der Cutis selbst sind auffallend die stark erweiterten und gefüllten Gefäße. Makroskopisch waren ja schon auf der Haut petechiale Blutungen aufgefallen. Diese Extravasationen, die in die Gewebsspalten erfolgt sind, sind wohl durch den Hindurchtritt von Blut durch die mikroskopisch intakt erscheinende Gefäßwand zu erklären. Diese Durchlässigkeit der Gefäße ist wohl auf toxische Schädigungen zurückzuführen. Die Cutis war von Leukozyten infiltriert. An den Gefäßwänden in der Cutis kam es zu perivaskulären Ablagerungen von Pigmenten, die sich manchmal auch selbst über die ganzen Gefäße ausdehnten. Die

Pigmentablagerungen waren aber auch im Stratum laxum zu bemerken. Die Schädigungen der Haut gingen nicht parallel mit den Zerstörungen der Kiemen. Bei einem 0,024 mg Ozongehalt/l Wasser traten die ersten Hautveränderungen nach 5 Stunden auf.

Abb.32: Histologischer Schnitt durch die Haut einer Regenbogenforelle (H.-E.-Färbg.)



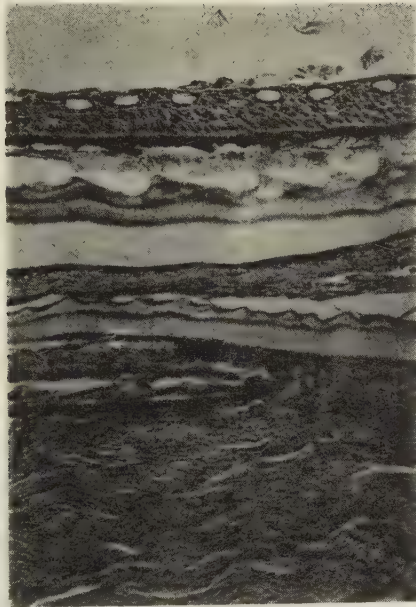
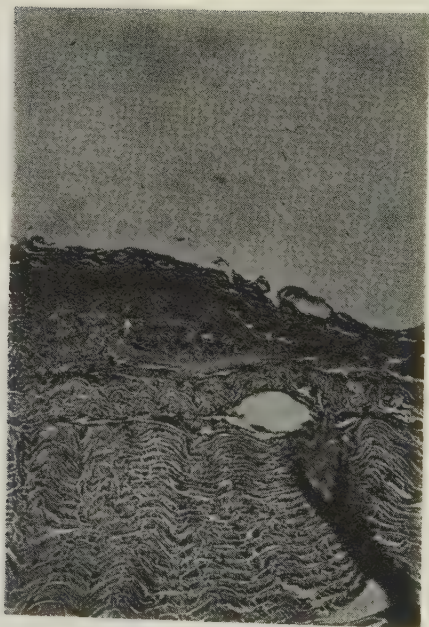


Abb.33: Oberflächlicher  
Zerfall der Epi-  
dermis und Pig-  
mentvermehrung  
im Stratum laxum  
nach Ozoneinfluß  
(H.-E.-Färbg.)



Abb.34: Zerstörung der  
Epidermis, Pig-  
mentzunahme und  
Gefäßvermehrung  
(H.-E.-Färbg.)

Abb.35: Nekroseherde und  
Größenzunahme  
der Gefäße nach  
Ozoneinfluß  
(H.-E.-Färbg.)



### III. Leber

#### 1. Anatomie der Leber

Die Leber der Forelle ist ungelappt und von braun-roter Farbe. Sie liegt im kranialen Teil der Leibeshöhle. Die Konsistenz der Leber ist weich und locker. Die Gallenblase liegt an der intestinalen Fläche der Leber. Neben der Produktion von Verdauungsfermenten hat die Leber die wichtige Funktion, Abbauprodukte und Giftstoffe aus dem Blut zu entfernen. Die Leber bildet weiterhin ein großes Reservoir für den Blutzucker (Glykogen). Nach ELIAS und BENGELSDORF (1952) ist die Leber der niederen Wirbeltiere keine netzig-tubulöse Drüse, sondern besteht aus einem zusammenhängenden Parenchym, das bei den Fischen aus einer zweizellenstarken Mauer gebildet und von Lakunen mit den Sinusoiden durchzogen ist. Nach SCHMIDT (1960) muß die Leber dem tubulosinusoiden Typ zugeordnet werden. Bindegewebe kommt in der Leber von Forellen nur wenig vor. Nach PLEHN (1915) zieht sich lediglich eine bindegewebige Scheide um die Gefäße. Die Arterienäste oder Venen und die Gallengänge verlaufen häufig zusammen. Die Unterscheidung von Lebervenen und Pfortaderästen soll nach SCHMIDT (1960) nicht möglich sein, da keine Media in der Lebervenenwand zu finden ist. Nach RIGGERT (1922) soll bei der Regenbogenforelle eher als bei der Bachforelle natürlicherweise Fett in der Leber vorhanden sein.

## 2. Histologische Leberuntersuchungen an Versuchs- und Kontrollfischen

Die Leberschädigungen traten ungefähr nach einer dreistündigen Behandlung mit 0,024 mg Ozon/l Wasser auf. Makroskopisch betrachtet, sahen die Lebern zum Teil nach Stauungslebern aus. In diesem Stadium waren trotz vollständiger Ausblutung stark gefüllte Gefäße und vereinzelte Petechien an der Leberoberfläche. Der histologische Schnitt zeigte eine starke Hyperämie mit Erweiterung der Kapillaren und der Sinusoide. Die Sinusräume waren häufig gefüllt mit eosinophilem Material. Teilweise waren die Wände der Sinusoide geschädigt, so daß Blutkörperchen im ganzen Lebergewebe auftraten. Durch die stark vergrößerten Kapillaren und vorhandenen Extravasate zwischen den Zellen, fand eine druckatrophische Degeneration der Leberzellstrukturen statt. Später konnte auch eine Zunahme von Bindegewebe um alle Arten von Gefäßen beobachtet werden. Die Schädigungen betrafen dann auch das Plasma und die Kerne der Leberzellen. So besaßen viele Leberzellen in ihrem Protoplasma rundliche und manchmal scharf begrenzte Aufhellungen, die ungefähr Kerngröße erreichten. Die Leberzelle ist dabei nicht vergrößert. Das Plasma wird durch die Vakuole nur expansiv verdrängt. Diese Vakuolen waren zum Teil optisch leer, der andere Teil enthielt anfärbbare Substanz. Fettfarbstoffe wurden von diesem Inhalt nicht angenommen. Die Kerne dieser Zellen waren zum Teil ohne Veränderungen. Die veränderten Kerne waren pyknotischer Struktur. Diese veränderten

Zellen traten vor allen Dingen mehr zum Leberrand hin auf, was wohl mit der dort schlechteren Blutversorgung zusammenhängen kann. Daneben war auch eine Hyperplasie der Kupfer'schen Sternzellen zu bemerken, was auf eine Abwehrreaktion hindeutete.



Abb.36: Histologischer Leberschnitt einer gesunden Regenbogenforelle (H.-E.-Färbg.)

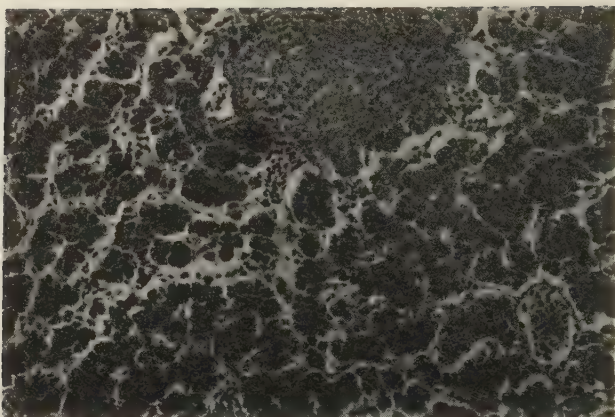


Abb.37: Starke Blutfülle und vakuoläre Degeneration der Forellenleber nach Ozoneinfluß (H.-E.-Färbg.)

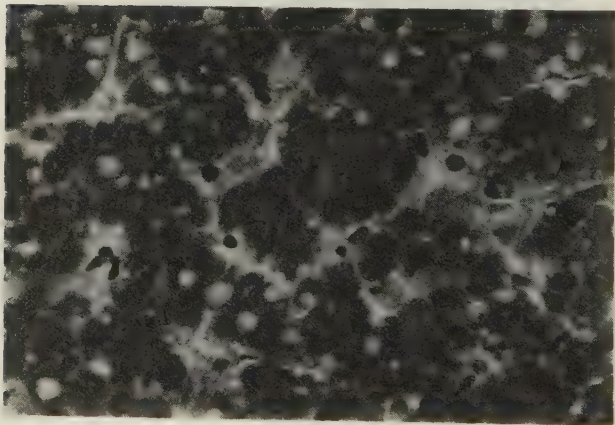


Abb.38: Vakuoläre Degeneration der Leber. Vakuolen mit kugelförmigen Einschlüssen (H.-E.-Färbg.)

#### E. Die Ozoneinwirkung auf die Eier und geschlüpfte Brut der Regenbogenforelle

---

Eine große wirtschaftliche Rolle spielen in den Teichwirtschaften die durch Pilze oder Parasiten verursachten Schäden an Fischeiern. Vor allen Dingen werden abgestorbene Eier sehr leicht von Saprolegnien befallen, die dann auch schnell auf gesunde Eier übergreifen können. Zur Bekämpfung dieser Schädlinge wurden bisher mit wechselndem Erfolg verschiedene Chemikalien eingesetzt. Von diesen Stoffen hat sich in den vergangenen Jahren besonders der Farbstoff Malachitgrün durchgesetzt. BAUMGARTNER (1969) konnte aber bei seinen Untersuchungen über die Wirkung von Malachitgrün auf die Organe von Jungfischen feststellen, daß das Malachitgrün Schäden an den Organen von Fischen verursacht. Bei sehr hohen Konzentrationen treten auch nach kurzer Einwirkungsdauer Schäden auf und wiederholtes Behandeln mit Malachitgrün löst vorzeitiges Schlüpfen aus, wodurch die Brut nicht lebensfähig ist (DEUFEL, 1957).

Die Anwendung von Malachitgrün ist also mit Schäden an den Fischen verbunden, so daß die Frage nach einem neuen Mittel gegen den Saprolegnienbefall der Eier auftauchte. Da Ozon schon erfolgreich in der Pilzbekämpfung eingesetzt wurde, lag es nahe, es auch bei Forelleneiern auszuprobieren. Für meine Versuche standen mir leider keine pilzbefallenen Eier zur Verfügung, so daß nur die eventuell vorhandenen Schädigungen der Eier und geschlüpften Brut durch Ozon untersucht wurden. Von BENOIT und MATLIN (1966) wurde die Wirkung des Ozons auf verpilzte Regenbogenforelleneier untersucht, jedoch

nicht im Wasser, sondern in der eingeleiteten Luft. Die Ozonkonzentrationen der Luft lagen zwischen 26 und 65 ppm. Die Autoren stellten folgendes fest: Die toten klaren Eier verpilzten weiterhin, lebende und nicht geschlüpfte Eier verpilzten nur in geringer Anzahl und die Sterbequote der geschlüpften Brut war durch die Ozonbehandlung nicht erhöht.

Wie bereits erwähnt, arbeitete ich nur mit unverpilzten und lebenden Eiern im Augenpunktstadium. Die Ozonkonzentration des Wassers betrug meistens 0,024 mg Ozon/l Wasser. Die Forelleneier wurden in flache Petrischalen gelegt und dann in das Versuchsbecken gebracht. Vorher wurden alle Versuchs- und Kontrolleier daraufhin untersucht, ob sie leben. Wie aus der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen ist, ging der längste Versuch über 42 Stunden und der kürzeste über 6 Stunden. Insgesamt wurden 360 Eier in den Ozonversuch genommen. Von diesen 360 behandelten Eiern waren insgesamt nur 100 lebende Larven nach Versuchsende übrig geblieben. Diese niedrige Zahl erklärt sich aber auch aus den großen Ausfällen an geschlüpfter Brut, die dadurch bedingt waren, daß die während des Versuchs geschlüpften Larven vom ozonisierten Wasser getötet wurden. Vergleicht man die Anzahl der im Versuch geschlüpften Larven mit denen der Kontrolleier, so fällt auf, daß die Versuchslarven im ozonisierten Wasser früher ausschlüpfen. Um festzustellen, wie lange die Larven bei einer Ozonkonzentration von 0,024 mg/l Wasser überleben können, nahm ich 50 normal geschlüpfte Larven in den Versuch. Die Larven zeigten schon kurz nach Beginn des Versuches starke Unruhe, die sich im weiteren Verlauf zu starken Kreisbewegungen steigerte. Die ersten Larven starben nach 30 min. Nach 1 1/2 Stunden waren alle 50 Tiere

durch das ozonisierte Wasser getötet worden. Äußerlich erschienen die Larven wie verpilzt, denn neben Epidermisläsionen hatten sie eine milchige Farbe angenommen. Blutungen im Augen- und Körperbereich traten ebenfalls auf. Vergleicht man nun die letzten Versuchsergebnisse mit den Ergebnissen der Forelleneierversuche, dann erscheint der große Ausfall der lebendgeschlüpften Larven durch das Einwirken des Ozonwassers während des Versuches bedingt zu sein. Die Schädigung durch das Ozon scheint primär ein früheres Schlüpfen der Larven auszulösen, die dann gerade in den langen Versuchen von 42 und 24 Stunden dem Ozon schutzlos ausgeliefert sind. Bemerkenswert ist auch die Zunahme an solchen Fällen, in denen nicht der Kopf oder der Schwanz der Larve die Eihülle zuerst durchbricht, sondern ein Teil der Dotterblase als erstes auf der Eioberfläche erscheint. Am häufigsten trat diese Erscheinung während des Langzeitversuches von 42 Stunden auf. Waren es hier schon 10 Fälle, so kamen noch weitere 15 bei den Versuchseiern vor, die nach beendetem Versuch sich weiterentwickelt hatten. Von insgesamt 360 Versuchseiern waren 25 Eier mit Dotterblasendurchbruch zu zählen. Diese Larven waren bereits tot oder starben nach kurzer Zeit. Fast das gleiche Resultat wurde bei den Eiern festgestellt, bei denen die Larven sich nur mit dem Kopf aus der Eihülle befreien konnten. Die ausgetretenen Köpfe der im Versuch stehenden Jungtiere wurden dann bereits durch das ozonisierte Wasser getötet. Allerdings kann auch an eine durch das Ozon bereits stattgefundene Schädigung und Schwächung der Embryonen im Ei gedacht werden, die dann nicht die Kraft besaßen, sich aus der Eihülle zu befreien. Dafür spricht eigentlich auch die große

Anzahl der während des Versuches vollständig ausgetretenen Fische. Auffallend ist auch die verhältnismäßig große Anzahl der abgestorbenen Eier. Das ist besonders festzustellen in den beiden Langzeitversuchen von 42 und 24 Stunden. Insgesamt waren 46 Eier abgestorben, was, verglichen mit den Kontrolleiern mit 2 abgestorbenen Eiern bei insgesamt 160, relativ hoch ist. Die Versuchseier hatten einen weißlichen Schimmer angenommen und bei den Lebenduntersuchungen der Jungfische in den Eiern waren Blutungen am Körper festzustellen. 3 Tage nach dem Versuchsende waren alle noch lebenden Versuchseier ausgeschlüpft. Wie aus der nachfolgenden Tabelle zu ersehen ist, gab es auch bei diesen Eiern noch viele Ausfälle durch Dotterblasendurchbruch, Kopfaustritt und abgestorbene Brut. Die gesamten Ausfälle beliefen sich auf 260 Eier von insgesamt 360 Ausgangseiern. Vergleichen wir dieses Resultat mit dem der Kontrolleier, bei denen von 160 Eiern nur 8 sich nicht entwickelten, so ist ein großer Unterschied festzustellen, der wohl auf der Wirkung des Ozons beruhen dürfte.

Tabelle: Ozonversuche mit Regenbogenforelleneiern und Brut

| Anzahl der Eier          | Dauer des Versuchs in Stunden | mg Ozon/ 1 Wasser | lebende Brut | tote Brut | Dotter ausgetreten + | Kopf ausgetreten + | Eier lebend | Eier tot |
|--------------------------|-------------------------------|-------------------|--------------|-----------|----------------------|--------------------|-------------|----------|
| 130                      | 42                            | 0,024             | -            | 70        | 10                   | 10                 | 20          | 20       |
| 120                      | 24                            | 0,023             | 21           | 32        | -                    | -                  | 46          | 21       |
| 110                      | 6                             | 0,023             | 33           | 37        | -                    | -                  | 40          | -        |
| geschl. Brut             |                               |                   |              |           |                      |                    |             |          |
| 50                       | 1,5                           | 0,025             | -            | 50        | -                    | -                  | -           | -        |
| Kontroll-eier            |                               |                   |              |           |                      |                    |             |          |
| 160                      | -                             | -                 | 152          | -         | -                    | 6                  | -           | 2        |
| 3 Tage nach Versuchsende |                               |                   |              |           |                      |                    |             |          |
| 20                       | 42                            | 0,024             | 8            | -         | 7                    | 4                  | -           | 1        |
| 46                       | 24                            | 0,023             | 20           | 14        | 3                    | 8                  | -           | 1        |
| 40                       | 6                             | 0,023             | 18           | 10        | 5                    | 4                  | -           | 3        |
| Versuchseier insgesamt   | -                             | -                 | 100          | 163       | 25                   | 26                 | -           | 46       |

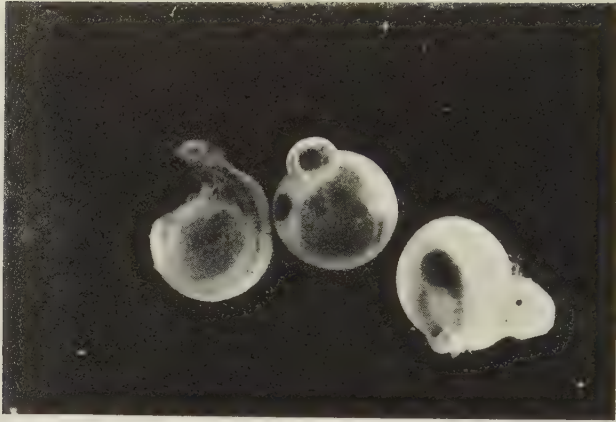


Abb.39: Ozonisierte Eier mit Dotterblasen-  
durchbruch und Kopfaustritt

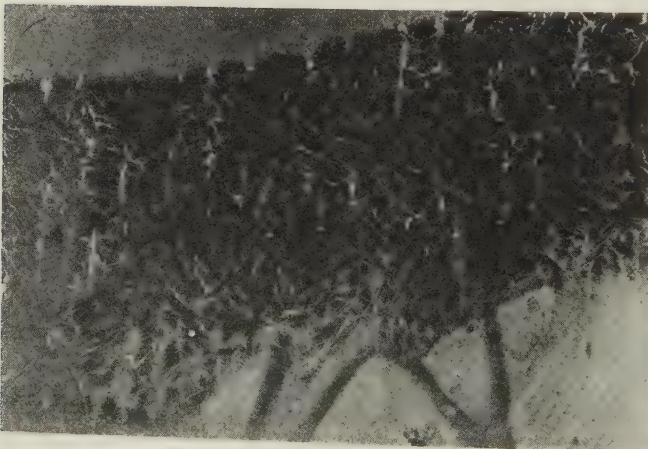


Abb.40: Elektronenmikroskopische Aufnahme  
von einer ozonisierten Eihülle  
(Vergrößerung 1600)

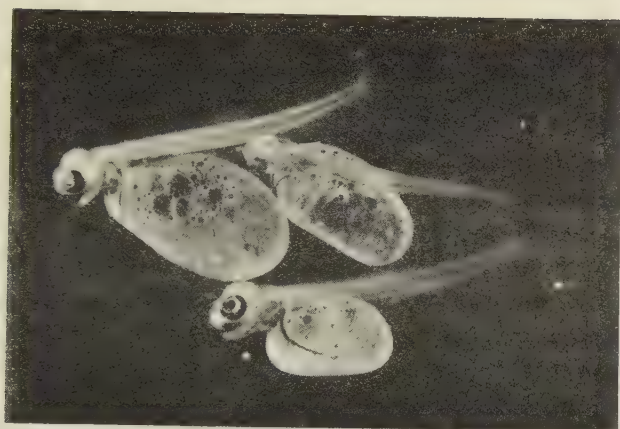


Abb. 41: Geschlüpfte Brut von ozonisierten Eiern mit stark vergrößerter Dotterblase und Blutungen (Auge) und Dotterblaserwassersucht. (Zum Vergleich die untere gesunde Larve)

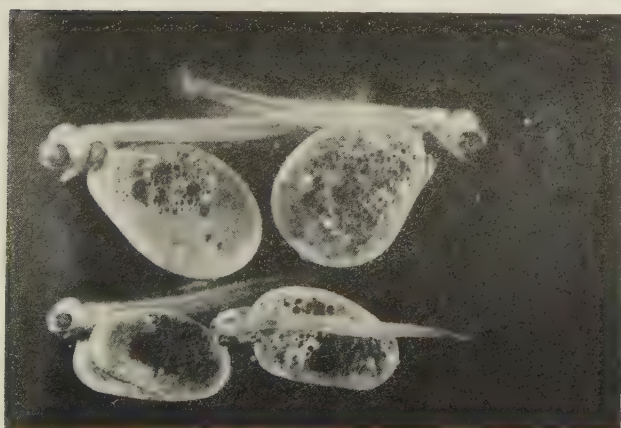


Abb. 42: Vier geschlüpfte Larven von ozonisierten Eiern

## F. Besprechung der Ergebnisse

Es galt, zu untersuchen, inwieweit sich nach Einwirkung von Ozon bei Fischen Organschäden zeigen. Von allen Organen wurde besonders das Blut auf Veränderungen untersucht und die Erythrozyten- und Leukozytenanzahl, der Hämatokritwert, der Hämoglobingehalt, der Blutzucker, das Gesamteiweiß und die verschiedenen Serumproteine durch die Elektrophorese bestimmt. Fast alle Versuche wurden bei einer Ozonkonzentration von 0,024 mg/l Wasser durchgeführt.

Bei den korpuskulären Bestandteilen des Blutes ist bis zur 4. Versuchsgruppe eine auffallende Parallelität der Werte festzustellen. Erst nach der 4. Versuchsgruppe kommt es zu einem Abfall der Leukozyten, während die Erythrozyten weiter ansteigen. Die 1. Versuchsgruppe, mit einer Versuchsdauer von 2 Stunden, zeigte ein erstes Maximum, das weit über den Normalwerten liegt. Für diese Erhöhung der Erythrozyten und Leukozyten können mehrere Möglichkeiten in Frage kommen. Als erstes muß wohl an die Mobilisierung der gespeicherten Blutkörperchen gedacht werden. Als Erythrozytenspeicher kommen hauptsächlich die Milz und die Niere in Frage. Als zweites ist an eine erhöhte Neubildung von Erythrozyten zu denken. Bei den Fischen würde sich das in einer Aktivierung des Blutbildungsgewebes in der Kopfniere bemerkbar machen. Als dritte Möglichkeit könnte eine Eindickung des Blutes durch Flüssigkeitsentzug vorliegen. Um feststellen zu können, um welche der drei Möglichkeiten es sich in diesem Stadium handelt, müssen die Gesamteiweißwerte mit herangezogen werden. Die Eiweißwerte erreichen zwar nach zwei Stunden nicht ihr Maximum, sind aber gegenüber dem Normalwert erhöht und steigen weiterhin bis zur

Versuchsgruppe II, mit 3,5 Stunden, an. Aus diesen Werten könnte man auf einen Flüssigkeitsverlust schließen, denn das Ansteigen der Blutkörperchen und die gleichzeitige Erhöhung des Gesamteiweißes deuten darauf hin. Beziehen wir den Hämatokritwert der Versuchsgruppe I mit in die Auswertung ein, so ist auch hier ein starker Anstieg festzustellen. Da der Hämatokritwert Auskunft gibt über die Wasserverschiebung zwischen Plasma und Erythrozyten sowie zwischen Blut und extravasalem Flüssigkeitsraum, deutet auch dieser Wert auf einen Flüssigkeitsverlust hin. Die elektrophoretische Auftrennung des Serums der Forellen, die nach 2 Stunden die irreversiblen Schäden erreicht haben, zeigen eine geringe Verringerung des Albuminanteils, dagegen aber eine Zunahme des Globulinanteils.

Nach diesen Versuchsergebnissen könnte die Annahme berechtigt sein, daß es nach einem Zeitraum von 2 Stunden zu einer Eindickung des Blutes kommt. Der Anstieg der Erythrozyten ist demnach wohl in erster Linie auf die Veränderung des Verhältnisses zwischen Blutkörperchen und Blutplasma zurückzuführen. Die Ursache für diese Verschiebung kann wohl in einer Erhöhung des Blutdruckes und in den bereits vorhandenen Epithelschäden der Kiemenlamellen gefunden werden. Die Schädigungen der Kiemen waren zwar noch nicht so erheblich, können aber für den Flüssigkeitsverlust des Blutes schon verantwortlich gemacht werden. Das scheint aber nicht die einzige Reaktion des Fischkörpers auf den toxischen Reiz durch Ozon zu sein. So konnten im Blutaussstrich schon jugendliche Erythrozytenformen erkannt werden. Dieses wiederum deutet darauf hin, daß alle Blutreserven vom Fisch mobilisiert worden sind, um den wahrscheinlich durch äußere Schäden verursachten

Sauerstoffmangel zu kompensieren. Neben der Mobilisierung von Erythrozyten ist auch mit einer Erhöhung des Hämoglobingehaltes der einzelnen Blutkörperchen zu rechnen. Die Versuchsergebnisse für die Gruppe I zeigen aber einen parallelen Verlauf zum Anstieg der Erythrozyten, so daß man von keiner Veränderung des Hämoglobingehaltes sprechen kann. Wenn auch nicht die osmotische Resistenz der Erythrozyten geprüft worden ist, so konnte in diesem Versuchsstadium keine Tendenz zur Hämolyse festgestellt werden, die sicherlich beim Blutausschlag oder der Serumgewinnung bemerkt worden wäre.

Schon bei der elektrophoretischen Bluteiweißuntersuchung der Gruppe I zeigt sich eine Tendenz, die bei den anderen Gruppen noch auffälliger in Erscheinung tritt. Sie äußert sich in einer Abnahme der Albumine zugunsten der Globuline. Dies ist nicht nur durch die Elektrophorese festzustellen, sondern auch mit der modifizierten Gesamteiweißbestimmung durch die der quantitative Anteil der Albumine am Gesamteiweiß festgestellt werden kann. Die Abnahme der Albumine im Serum der Versuchsfische läßt vermuten, daß damit gleichzeitig die osmotische Funktion der Serumproteine gestört ist. Da die Kapillärwände wasserdurchlässig sind, benötigt das Kreislaufsystem hochmolekulare Stoffe, die die Kapillärwände nicht durchdringen können. Diese Kolloide besitzen eine osmotische Wasseranziehung, deren Größe dem Blutdruck in den Kapillaren entspricht. Da die Serumalbumine das kleinste Molekulargewicht besitzen, entfallen ungefähr 80 % des kolloidosmotischen Drucks auf die Albumine. Beachtet man diese Tatsache und sieht sich die Versuchsergebnisse an, die eine Abnahme der Albumine anzeigen, so deutet vieles darauf hin, daß der Anstieg der Blutwerte

hauptsächlich auf einen Flüssigkeitsverlust zurückzuführen ist. Die Schädigung der Gefäße ermöglicht so den Proteinen mit dem kleinsten Molekulargewicht, aus dem Gefäßsystem auszutreten und das osmotische Gleichgewicht des Blutes zu verändern. Die Zunahme der Globuline betrifft nicht nur den  $\gamma$ -Bereich, sondern erfaßt auch zahlreiche andere Fraktionen im Globulinbereich. Man kann in diesem Stadium also nicht allein von einer spezifischen Erhöhung der  $\gamma$ -Globuline sprechen, wie sie von STOKINGER (1965) festgestellt wurde.

Der Blutzuckerwert der Versuchsgruppe I zeigt ein sehr deutliches Absinken. Der von über 40 Forellen aufgestellte Normalwert beträgt 98,7 mg/100 ml Blut, dem ein Wert von 34 mg/100 ml Blut der Versuchsfische gegenübersteht. Die Jahreszeit, der Ernährungszustand, das Geschlecht usw. der Fische können keine Rolle bei der Festsetzung der Blutzuckerwerte gespielt haben, da, wie aus den bereits geschilderten Verhältnissen zu entnehmen ist, in diesen Dingen kaum eine Differenz zwischen Kontroll- und Versuchsfischen bestand. Der starke Abfall des Blutzuckers deutet auch nicht auf einen Sauerstoffmangel hin, denn wie aus der Literatur ersichtlich ist, ist bei auftretendem Sauerstoffmangel mit einer Blutzuckererhöhung zu rechnen. Die Hypoglykämie kann bedingt sein durch erhöhten Verbrauch an Glucose bei gleicher Zufuhr oder durch verminderte Zufuhr bei gleichem Verbrauch von Blutzucker.

Wie weit die Blutzuckersenkung durch andere Faktoren verursacht worden ist, kann nur schwer festgestellt werden. Zu denken ist an eine hormonale Einflußnahme, eine Leberschädigung, einen erhöhten Verbrauch an Glucose durch

die vermehrte Muskeltätigkeit oder den Verlust von Eiweißstoffen, die für den Transport der Glucose mit verantwortlich sind.

Wie weit das Insulin oder das Parathormon für den Abfall der Blutzuckerwerte in Frage kommen, konnte leider nicht geklärt werden. Da der Leber eine wichtige Aufgabe in der Aufrechterhaltung des Blutzuckerspiegels zufällt, wird die in diesem Versuchsstadium aufgetretene vakuoläre Degeneration der Leber nicht ohne Folge für diesen geblieben sein.

Sehen wir uns die Versuchsergebnisse in dieser Gruppe I mit einer Versuchsdauer von 2 Stunden an, so ist bei allen Werten bis auf den Blutzuckerspiegel und einige elektrophoretisch dargestellte Albuminfraktionen ein Anstieg zu verzeichnen. Aufgrund dieser Werte ist nicht eindeutig festzustellen, warum die Tiere zu diesem Zeitpunkt schon das Stadium der irreversiblen Schädigung erreicht hatten. Die histologischen Untersuchungen, die in diesem Stadium noch keine großen Schäden aufzeigten, können wohl nicht die Ursache für den frühzeitigen Ausfall dieser Fische sein. Da einige Fische sehr niedrige Blutzuckerwerte zeigten, ist eventuell in diesem Stadium an einen hypoglykämischen Schock zu denken, der sich durch starke Unruhe, Übererregbarkeit, Erbrechen von Futter, Muskelzuckungen und ausgedehnte Krämpfe äußert. Die Abnahme des Blutzuckerspiegels von 98,7 mg/100 ml Blut auf 34,0 mg/100 ml Blut der Versuchsfische der Gruppe I ist doch recht erheblich.

Die Gruppe I, mit einer Versuchsdauer von 2 Stunden, zeigt also einen starken Abfall der Blutzuckerwerte, eine

Verringerung des Albumins und einen Flüssigkeitsverlust des Serums. Ein Anstieg ist bei korpuskulären Bestandteilen zu verzeichnen, während der Hämoglobingehalt der Erythrozyten gleichbleibt. Histologische Veränderungen sind schon an den Kiemen und der Leber festzustellen. Hyperplasien der Epithelzellen der Kiemenlamellen treten auf. Die Leber zeichnet sich durch eine starke Blutfülle und das Auftreten vakuolärer Degenerationsbezirke aus.

Nach diesem Maximum der ersten Versuchsgruppe kommt es in den nächsten beiden Gruppen zu einem starken Absinken der Blutwerte. Die tiefsten Erythrozyten-, Leukozyten- und Hämoglobinwerte treten in der Versuchsgruppe III nach 5,5 Stunden Ozoneinfluß auf. In dieser Zeit sind auch viele Ausfälle an ozonisierten Regenbogenforellen zu verzeichnen. In der Versuchsgruppe II ist zwar das Maximum des Gesamteiweißes festzustellen, jedoch eine Abnahme der Blutkörperchen gegenüber der ersten Versuchsgruppe. Das deutet darauf hin, daß die absolute Zahl der Blutkörperchen abnimmt und daß weiterhin ein Flüssigkeitsverlust des Blutes zu verzeichnen ist. Die Verringerung der Blutkörperchen kann aus zwei Gründen stattgefunden haben. Erstens können sich die Fische an die Versuchsbedingungen angepaßt haben und es kommt zu einer rückläufigen Bewegung. Zweitens können die verursachten Schädigungen durch Ozon dazu geführt haben, daß es zum Austritt von Blutkörperchen aus dem Blutkreislauf kommt. Möglich wäre auch eine Verschiebung der Wasserverhältnisse zwischen Plasma und Erythrozyten in dem Sinne, daß die Erythrozyten, bedingt durch die veränderten osmotischen Verhältnisse, Wasser an das Plasma abgeben. Dagegen spricht aber der Hämatokrit- und Gesamteiweißwert, die auf eine absolute Verringerung der Blutkörperchen und

Verlust an Flüssigkeit hindeuten. Die elektrophoretische Serumuntersuchung dieser Versuchsgruppe zeigt die Fortsetzung der in der ersten Versuchsgruppe eingeleiteten Prozesse: Eine Abnahme der Albumine und Postalbumine und eine Zunahme der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globuline. Der Verlust an Albuminen hält also weiterhin an. Die histologischen Untersuchungen zeigen jetzt eine fortgeschrittene Schädigung der Zellen von Kiemen und Haut. Zwischen den Kiemenlamellen treten stellenweise geschädigte Blutkörperchen auf und im Gewebe der Haut kommt es zu Blutkörpercheninfiltration. Der Hämoglobingehalt des Blutes hat sich nicht verändert. Von der Beurteilung der Blutwerte her ist es schwierig, eine eindeutige Aussage über die Ursache des Ausfalls von Forellen in diesem Stadium zu machen. Allein die histologischen Schädigungen geben dafür einen Anhaltspunkt.

Die dritte Versuchsgruppe, mit einer Behandlungsdauer von 5,5 Stunden, zeigt die tiefsten signifikanten Blutwerte. Der Verlust an Blutkörperchen ist schon makroskopisch an den sehr häufig auftretenden Haut-, Flossen- und Kiemenblutungen zu bemerken. Histologisch konnten die Beobachtungen abgesichert werden. Es muß hier zu einer Schädigung der Blutgefäße kommen, die dann das Austreten von korpuskulären Blutbestandteilen und Serumproteinen ermöglicht. Eine starke Abnahme der Erythrozyten, der Leukozyten und des Gesamteiweißes dürfte die Ursache für die meisten Ausfälle in dieser Gruppe sein. Der Hämatokritwert bleibt gleich und kann deshalb als Beweis herangezogen werden für die gleichzeitige Abnahme der Blutkörperchen und der Blutflüssigkeit. Unterstützt wird diese Aussage durch das Pherogramm der Serumproteine dieser Versuchsgruppe. Eine weitere Verringerung der Albumine zugunsten der Globuline

ist feststellbar. Da die Albumine den größten Teil der Serumproteine ausmachen, spielt die Abnahme dieser Proteine für die Höhe des Gesamteiweißwertes eine große Rolle. Der Hämoglobinwert hat sich nicht verändert und läuft deshalb parallel zur Anzahl der Erythrozyten. Der Blutzucker hat wieder einen niedrigeren Stand erreicht. Im Blutaussstrich kann bei den Erythrozyten die Tendenz zur Abrundung festgestellt werden. Es ist durchaus möglich, daß durch diese Veränderung der Erythrozyten der Abbau dieser Blutbestandteile beschleunigt wird. Die histologischen Veränderungen der Kiemen sind besonders auffällig. Die Epithelzellen der Kiemenlamellen sind zerstört und zum Teil liegen sogar die Sinusoide frei, so daß es zu Blutverlusten kommen kann. Die Leber zeigt neben der vakuolären Degeneration und starken Infiltration von Blutkörperchen geschädigte Zellkerne. Das Auftreten der vakuolären Degeneration ist besonders typisch für Hypoxydosen. Da die Leber besonders empfindlich für Sauerstoffmangel ist, kommt es besonders in diesem Organ zu Schäden, die sich dann als runde Hohlräume im Protoplasma manifestieren. In den Hohlräumen befindet sich teilweise anfärbbare Eiweißflüssigkeit. Ist genügend Glykogen in der Leber vorhanden, so soll diese Vakuolenbildung behindert werden. Vielleicht hängt damit auch der niedrige Blutzuckerspiegel zusammen. Die Zellzerstörung durch Ozon nimmt ihren Anfang in einer Schädigung der Zellmembran, der sich dann eine Depolymerisation der Proteine und Nucleinsäuren anschließt. Damit ist die Zelle abgetötet worden.

Die vorletzte Versuchsgruppe, mit einer geringen Ausfallsquote und einer Versuchsdauer von 7,5 Stunden, zeigt eine

Erhöhung der Blutkörperchenanzahl gegenüber der dritten Gruppe. Nur der Gesamteiweiß- und Blutzuckerwert ist weiter gefallen, was sich auch bei den Serumproteinen im elektrophoretischen Pherogramm dieser Gruppe durch eine weitere Abnahme der Albumine, verbunden mit einer Zunahme besonders der  $\gamma$ -Globuline, widerspiegelt. Wie weit es hier durch die Eiweiß denaturierende Eigenschaft des Ozons zu Antikörperbildung kommt, konnte nicht geklärt werden.

Bei der vierten Versuchsgruppe, aber noch mehr bei der fünften Versuchsgruppe, ist bis auf den weiter fallenden Blutzuckerspiegel und die sinkende Leukozytenanzahl eine Normalisierung festzustellen, die sich bei weiterem Verlauf einem zweiten Maximumwert zu nähern scheint.

Trotz der auch vielfältigen Gewebeschäden scheinen diese Fische eine starke Resistenz gegenüber dem Ozonwasser aufgebracht zu haben. Diese Resistenz scheint individuell sehr verschieden zu sein. Das mag in bezug auf die Erythrozyten damit zusammenhängen, wie schnell der Fisch sich auf die veränderte Umwelt einstellen kann und der Organismus in der Lage ist, die toxischen Reize mit seinem Abwehrmechanismus zu kompensieren. Die irreversiblen Schädigungen der Versuchsfische scheinen aber primär ihre Ursache in der Zerstörung der Gewebe durch Ozon zu haben. Diese wiederum führen zu erheblichen Schwierigkeiten in der Sauerstoffaufnahme, die sich im Anfangsstadium durch Erhöhung der Blutbestandteile äußert. Erst im weiteren Verlauf der Versuche kommt es durch die erheblichen Gewebszerstörungen zu lebensbedrohenden Veränderungen der Blutwerte, die durch individuelle Resistenz und Anpassungsfähigkeit in gewissem Maße ausgeglichen

werden können. Am Anfang der Versuche, scheint es bei einigen Fischen zu einem schockartigen Zustand zu kommen, der sich in einem wilden Umherschwimmen im Aquarium und im Erbrechen von Futter äußert. Auffallend war es, daß die Fische, die sich von Anfang an ruhig im Versuchsbekken verhielten, die Versuche länger überstanden als diejenigen, die starke Unruhe zeigten. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Ergebnissen anderer toxischer Versuche am Fisch, so scheint im Reaktionsablauf vielfach eine gewisse Übereinstimmung zu bestehen. Es sieht so aus, als ob der Fisch gegenüber vielen Arten von toxischen Schädigungen mit den gleichen Abwehrmaßnahmen reagiert.

Tiefgreifende Schäden treten an Eiern und Embryonen nach Ozoneinwirkung auf. An der lebenden Brut der Versuchseier waren eigenartige Veränderungen festzustellen. Neben der typischen Form der Dotterblasenwassersucht tauchten Jungtiere auf, bei denen nur eine starke Vergrößerung des Dottersackes festzustellen war. Dabei kam es nicht zu dem typischen Bild der Dotterblasenwassersucht, wobei der Dotter von der zu einer Blase aufgetriebenen Haut umgeben wird. Ein Ascites, die sich zwischen dem Dotter und der äußeren Haut bei der Wassersucht ansonsten entwickelt, war hier nicht zu beobachten. Häufig waren Hämorrhagien unter dem Auge und dem Körper, die sich histologisch auch als solche charakterisieren ließen. Diese Veränderungen traten besonders bei den Langzeitversuchen auf. Wie kommt es zu diesen starken Ausfällen durch die Ozonisierung? Allgemein kann wohl gesagt werden, daß das Ozon eine Schädigung der Eihülle bewirkt. Es kommt an der Oberfläche der Eimembran zu Zerstörungerscheinungen, die wahrscheinlich insgesamt die Schale brüchiger machen und

dabei die Sauerstoffaufnahme der Larven behindern. Das beobachtete frühzeitige Austreten eines Teils der Dotterblase deutete meiner Meinung nach auf zwei Vorgänge hin: Einmal dürfte es zu einer Schädigung der Membrane kommen, die bei leicht erhöhtem Druck schneller nachgibt und zum anderen mag der erhöhte Druck, der von dem Embryo ausgeht, bedingt sein durch eine Größenzunahme der Dotterblase. Diese Größenzunahme könnte wiederum ihre Ursache darin haben, daß der Embryo nicht genügend Sauerstoff aufnehmen kann, eine direkte Schädigung des Fisches durch Ozon möglich ist oder das osmotische Gleichgewicht durch die Membranschädigungen zerstört worden ist. DIETRICH (1937) wies in ihrer Arbeit über die Dotterblasenwassersucht bei Salmoniden darauf hin, daß es auf Grund von Störungen in der Sauerstoffaufnahme nur in geringem Umfang zu der Dotterblasenwassersucht kommen kann. Bei Sauerstoffmangel soll hauptsächlich das Schlüpfen der Larven erschwert sein, so daß ein Teil der Fischchen im Ei stecken bleibt. Nach DIETRICH (1937) soll der Sauerstoffmangel vornehmlich die Lebenskraft und die Widerstandsfähigkeit der Tiere schwächen. Die Ansammlung von Transsudaten, wie sie bei der Dotterblasenwassersucht auftreten, soll ihre primäre Ursache in einer Schädigung der Kapillaren haben. Da es dann auch zu einer Schädigung der Nierengefäße kommt, läßt das Ausscheidungsvermögen dieses Organs nach und es kommt zu Flüssigkeitsansammlungen. Der entstandene Hydrops, verursacht durch den Gewebedruck, erhöht den Widerstand im Kreislauf und führt zu Maulsperre, Exophthalmus, Atembeschwerden und Hämorrhagien. Die Ursache für die Schädigungen der Gefäße konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Möglich wäre es, daß in meinen Versuchen durch Ozon diese Veränderungen hervor-

gerufen wurden. Einige Larven zeigten zwar einen vergrößerten Dottersack, ohne aber das typische Bild einer Dotterblasenwassersucht zu zeigen. Hier sieht es mehr nach einer Veränderung der osmotischen Vorgänge im Ei aus. Dafür spricht auch die starke Umfangsvermehrung der Dottersäcke im Ei, die dann zu den Durchbrüchen führen kann. Bei der Dotterblasenwassersucht entstehen die Blasen zum größten Teil erst nach dem Schlupf. Zur Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts im Forellenei ist die Vitellinmembran mit verantwortlich. Die Vitellinmembran umschließt den Embryo und den Dotter. Nach GRAY (1937) kann das Calcium mit seiner gewebsverdichtenden Wirkung die osmotischen Vorgänge im Ei beeinflussen. Fehlt das Calcium oder wird es durch andere Stoffe aus der Membran entfernt, so kann es zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Membran für andere Stoffe kommen. Damit wäre das osmotische Gleichgewicht gestört. Diese Möglichkeit ist nicht auszuschließen, da ja, wie bereits vorher berichtet wurde, sich auch die Härte des Wassers nach Ozoneinfluß verändert. Die Schädigung der Embryonen könnte also auf die direkte Einwirkung des Ozons auf das Calcium und die übrige organische Substanz der Membran zurückzuführen sein. Dadurch kommt es zu erheblichen osmotischen Gleichgewichtsstörungen im Ei, die dann schließlich das Sterben der Jungfische verursachen.

## G. Zusammenfassung

1. An Forellen wird der Einfluß des Ozons auf die Blutwerte und einzelnen Gewebe sowie Eier im Augenpunktstadium und geschlüpfte Brut untersucht. Die Ozonkonzentration des Wassers betrug in allen Versuchen 0,024 mg/l Wasser.
2. Das Auftreten von irreversiblen Schäden an den Forellen ist bei dieser Ozonkonzentration in einem Zeitraum von 1 bis zu 24 Stunden anzutreffen. Die größten Ausfälle liegen zwischen 3,5 und 5,5 Stunden. Die Blutentnahme fand im Stadium der irreversiblen Schädigungen der Fische statt.
3. Die statistische Auswertung sämtlicher gewonnener Blutwerte der Versuchsgruppen I bis V zeigt bei den Erythrozyten, den Blutzuckerwerten und der Zusammensetzung der Serumproteine Veränderungen. Die Erythrozytenanzahl der Versuchsfische erhöht sich signifikant, während der Blutzuckerwert um etwa 50% abfällt. Bei den Serumproteinen findet eine Verschiebung zwischen Albuminen und Globulinen zugunsten der letzteren statt. Die Globuline nehmen besonders im  $\gamma$ - und  $\beta$ -Bereich zu. Wie weit eine Antikörperbildung hier eine Rolle spielt, war nicht zu klären.
4. Die Versuchsergebnisse der Versuchsgruppen mit einer Einwirkung von 2,5 bis 5,5 Stunden zeigen signifikante Unterschiede in der Blutkörperchenanzahl, dem Hämatokrit, dem Gesamteiweißwert und den Serumproteinen.

Das erste Maximum wird nach 2,5 Stunden erreicht. Der Blutzuckerspiegel liegt zu dieser Zeit am tiefsten. Nach 5,5 Stunden haben die Blutwerte den tiefsten signifikanten Stand erreicht. Der Albuminanteil wird weiter zugunsten der Globuline abgebaut. Eine Abrundung der Erythrozyten ist zu erkennen. Nach einer Versuchszeit von 5,5 Stunden streben die Blutwerte, mit Ausnahme der Leukozyten und des Blutzuckers, einem zweiten Maximum zu. Nach einer Versuchsdauer von 7 Stunden kommt es zur stärksten Globulinbildung und der größten Abnahme an Albuminen.

5. Der primäre Angriffspunkt des Ozons scheint nicht das Blut, sondern das Gewebe zu sein. Die starke Schädigung der Kiemen und der Haut bewirken eine sekundäre Blutveränderung, die sich am Anfang in einer Erhöhung und später in einer Erniedrigung der Blutwerte äußert. Die vakuoläre Degeneration der Leber ist durch Hypoxydase bedingt. Das Ozon selbst dringt nicht in den Blutkreislauf ein.
6. Die anfängliche Erhöhung der Blutkörperchenzahlen ist auf eine Mobilisierung aller Reserven zurückzuführen sowie einen Flüssigkeitsverlust des Serums. Bei Gewebsschäden kommt es zum Verlust von Blutkörperchen und Serumproteinen.
7. Die Ausfälle von Fischen in einem früheren Versuchsstadium, scheinen auf eine Art Schock zurückzuführen zu sein. Sehr niedrige Blutzuckerwerte, hohe Blutkörperchenzahlen, starke Stimulierung, verbunden mit wildem Umherschwimmen, Muskelkrämpfen und Erbrechen von Futter, zeichnen diese Fische aus.

8. Entscheidend für die Dauer des Überlebens der Fische im Ozonwasser, scheinen die individuelle Resistenz und die Anpassungsfähigkeit gegenüber diesem toxischen Reiz zu sein.
9. Bei einer Ozonkonzentration von 0,024 mg/l Wasser treten nach einer Zeit von 6 Stunden Schädigungen an den Eihüllen auf, die zu einer Schwächung der Embryonen führen. Diese Schwächung wird hervorgerufen durch die schlechte Sauerstoffversorgung und die Veränderung des osmotischen Gleichgewichts im Ei.

## Summary

1. The influence of ozone on the blood-values and the various tissues of rainbow trout, and on the eggs as well as the newly-hatched fry is being examined. The water contained an  $O_3$ -concentration of 0,024 mg/l water.
2. Irreversible damage was caused by the  $O_3$ -concentration in the rainbow trout within a period of 1 to 24 hours. The greatest losses occurred between 3,5 and 5,5 hours. Blood samples were made after irreversible damage had been caused.
3. In the groups I to V the erythrocytes, the glucose-concentration and different serum-proteins showed statistically a change in the blood-values. The number of erythrocytes increased significantly, whereas the glucose-concentration sank approximately 50 %. The serum-proteins show a disarrangement in the concentration of albumins and globulins, whereby the latter increase. The globulins increase especially in the range of  $\gamma$  and  $\beta$ . The possible part of reproduction of antibodies was not clarified.
4. The experimental results of groups with an experimental time between 2,5 and 5,5 hours show significant changes in the amount of erythrocytes, the hematocrit and the total protein-content. The first maximum occurs after 2,5 hours. The glucose-concentration is here at its lowest level. The blood-values reach their lowest significant point after 5,5 hours.

The albumins diminish in favour of the globulins. A rounding of the erythrocytes can be noticed. After 5,5 hours the blood-values, except for the leucocytes and glucose concentrations reach a second maximum. After 7 hours the level of globulins shows a maximum and that of albumins a minimum.

5. The ozone appears to attack the tissue primarily, and not the blood. The greatly damaged gills and skin cause a secondary change in the blood, which causes at first an increase and then a decrease in the blood-values. The vacuolar degeneration of the liver is caused by hypoxydosis. The ozone itself does not penetrate the blood-circulation.
6. The primary increase in the number of erythrocytes is caused by the mobilisation of all reserves, as well as a decrease in the water-content of the serum. Tissue-damage causes a loss of blood-corpuscles and serum-proteins.
7. The loss of fish in an early experimental stadium, appears to be caused by shock. These fish show very low glucose-concentrations, a high concentration in blood-corpuscles, excitation combined with wild movements, muscle-cramps and the vomiting of food.
8. The individual resistance and adaptability of the fish concerning ozone-water, determine the survival-rate.

9. Damage of the egg-membranes, causing a weakening of the embryos, occurs by an ozone-concentration of 0,024 mg/l water after a period of 6 hours. This weakening is most likely caused by a poor availability of oxygen and a change in the osmotic equilibrium in the egg.

## H. Literaturverzeichnis

- 1) AMLACHER, E. (1957): Der Blutzucker normaler und an infektiöser Bauchwassersucht erkrankter Karpfen. Arch.Fischereiwiss. 8, 12-31
- 2) AMLACHER, E. (1961): Taschenbuch der Fischkrankheiten. Verlag Gustav Fischer, Jena
- 3) ANTHONY, A. (1960): Zit.in von BUDDENBROCK, 1967. Vergleichende Physiologie Band VI, 75
- 4) BAUMGARTNER, F. (1969): Die Wirkung von Malachitgrün auf innere Organe von Jungfischen, insbesondere *Salmo gairdneri* Rich. Dissertation Universität München
- 5) BENOIT, R.F. and N.A. MATLIN (1966): Control of Saprolegnia on Eggs of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) with Ozone. Trans.Amer.Fish.Soc. 95, 430-432
- 6) BEVERLANDER, G. (1935): A comparative study of the branchial epithelium in fishes. J.Morphol. 57, 335-348
- 7) BLACK, E.C., A. ROBERTSON CONNER, K.C. LAM and W.G.CHIU (1962): Changes in Glykogen, Pyruvate and Lactate in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) during and following Muscular Activity. J.Fish.Res.Bd.Canada 19, 409-436
- 8) BOUCK, G.R. and R.C. BALL (1965): Influence of a diurnal oxygen pulse on fish serum proteins. Trans.Amer.Fish.Soc. 94, 363-370
- 9) BRINGMANN, G.(1954): Die Wirkung von Ozon auf Organismen des Trinkwassers. Z.Hyg. 139
- 10) VON BUDDENBROCK, W. (1967): Blut und Herz. Band VI, von: Vergleichende Physiologie. Birkhäuser Verlag, Basel
- 11) CARLSON-JORDAN (1913): Zit.in: HUBBS, C.L. (1930): The high toxicity of nascent oxygen. Physiol.Zool. 3, 441-460

- 12) CUSHUY (1924): Zit.in HUBBS, C.L. (1930): The high toxicity of nascent oxygen.  
Physiol.Zool. 3, 441-460
- 13) DEUFEL, J. (1957): Behandlung von Fischeiern mit Malachitgrün.  
Der Fischwirt 6, 153-156
- 14) DIETRICH, E. (1937): Die Hydrocoele embryonalis (Dotterblasenwassersucht) der Salmoniden.  
Dissertation Universität München
- 15) DOMBROWSKI, H. (1953a): Hämatologische Studien an bauchwassersuchtkranken Karpfen.  
Biol.Zbl. 72, 353-363
- 16) DOMBROWSKI, H. (1953b): Das Blut des gesunden Karpfens.  
Der Fischwirt 10, 345-348
- 17) DOMBROWSKI, H. (1953c): Untersuchungen über das Blut des Karpfens und einiger anderer Süßwasserfischarten.  
Biol.Zbl. 72, 183-195
- 18) DORTA-SCHAEPII, Y. und W.D. TREADWELL (1949): Über eine kolorimetrische Bestimmung von hochverdünntem Ozon in Sauerstoff.  
Helv.chim.Acta 32, 356-364
- 19) DRILHON, A. (1954a): Etude des lipoprotéides sériques chez quelques poissons au moyen de l'électrophorèse sur papier.  
C.R.Acad.Sci. 238, 940-942
- 20) DRILHON, A. (1954b): Etude biologique de quelques protéides sériques de sang de poissons au moyen de l'électrophorèse sur papier.  
C.R.Soc.Biol. 148, 1218-1220
- 21) ELIAS, H. und H. BENGLSDORF (1952): The structure of the liver of vertebrates.  
Acta Anat. 14, 297-337
- 22) FLEMMING, H. (1958): Untersuchungen über die Bluteiweißkörper gesunder und bauchwassersuchtkranker Karpfen.  
Z.Fischerei N.F. 7, 91-152
- 23) FREEBAIRN, H.T. (1957): Mechanismus der Atmungshemmung durch Ozon.  
Mitteil.Angew.Chem. 69, 744

- 24) DE GRAAF, F. (1970): Das tropische Meerwasseraquarium.  
Verlag J. Neumann-Neudamm, Melsungen
- 25) GRAY, I.E. (1937): Zit.in DIETRICH, E. (1937): Die  
Hydrocoele embryonalis (Dotterblasenwassersucht)  
der Salmoniden.  
Dissertation Universität München
- 26) GRAY, I.E. und F.G. HALL (1930): Bloodsugar and acti-  
vity in fishes with notes on the action of insulin.  
Biol.Bull. 58
- 27) GUYARD, H., M. BOUCHARD, M. LAMARQUE und LESAGE DE LA  
HAYE (1968): Das Ozon und die Fische.  
La Pisciculture Française 13, 27-32
- 28) HAEMPEL, O. (1929): Über die Wirkung höherer Sauerstoff-  
konzentration auf Fische nebst Untersuchungen über  
die Ausnutzung des künstlich ins Wasser eingeleiteter  
O<sub>2</sub>.  
Zeitschr.f.vergl.Physiol. Bd. 7
- 29) HAIDER, G. (1969): Der Einfluß der Fangmethode auf Blut-  
und Serumuntersuchungen bei der Regenbogenforelle  
(Salmo gairdneri Rich.).  
Der Fischwirt 19, 196-200
- 30) HAIDER, G. (1970a): Alters- und saisonbedingte Ver-  
änderungen im Serumeiweißbild der Regenbogenforelle  
(Salmo gairdneri).  
Z.Fischerei N.F. 18, 107-124
- 31) HAIDER, G. (1970b): Hämatologische Beobachtungen an  
Regenbogenforellen (Salmo gairdneri Rich.).  
II. Blutzuckerspiegel.  
Z.Fischerei N.F. 18, 209-216
- 32) HALL, F.G. und I.E. GRAY (1927): The Haemoglobincon-  
centration of the Blood of Marine Fishes.  
J.Biol.Chem. 81
- 33) HALSBAND, E.J. (1963): Veränderungen des Blutbildes  
infolge toxischer Schäden.  
Arch.Fischereiwiss. 14, 68-85
- 34) HARDER, W. (1964): Anatomie der Fische.  
In: DEMOLL-MAIER-WUNSCH, Handbuch der Binnen-  
fischerei Mitteleuropas, II A u.B. Stuttgart,  
Schweizerbart

- 35) HETTCHE, O. (1953): Ozonbestimmung im Trinkwasser.  
Arch.Hyg.Bakt. 137, 117-125
- 36) HOFMEYER, L.W. (1907): Untersuchungen über normales  
und abnormales Fischblut.  
Dissertation Universität Bern
- 37) HOLLEMAN, A.F. und E. WIBERG (1960): Lehrbuch der  
anorganischen Chemie.  
Verlag Walter De Gruyter und Co., Berlin
- 38) HUBBS, C.L. (1930): The high toxicity of nascent oxygen.  
Physiol.Zool. 3, 441-460
- 39) HÜCKSTEDT, G. (1968): Aquarienchemie.  
Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart
- 40) HULTMANN, E. (1959): Zit.in Nature 183, 108 .
- 41) JONES, R.A., L.J. JENKINS, R.A. COON and J. SIEGEL  
(1970): Effects of Long-Term Continuous Inhalation  
of Ozone on Experimental Animals.  
Toxicol.appl.Pharmacol. 17, 189-202
- 42) KATZ, M. (1949): The hematology of the silver Salmon,  
Oncorhynchus Kisutch.  
Ph.D.thesis, University of Washington, Seattle,  
Washington
- 43) KIERMEIR, A. (1940): Über den Blutzucker der Süßwasser-  
fische.  
Z.vergl.Phys. 27, 460-491
- 44) LASZLEBEN, P. (1937): Untersuchungen am Blutzucker und  
an den Langerhansschen Inseln von Knochenfischen.  
Dissertation Universität München
- 45) LARSEN, H.N. and S.F. SMIESZKO (1961): Comparison of  
various methods of determination of hemoglobin  
in trout blood.  
Prog.Fish-Cult. 23, 8-17
- 46) LEUTELT, R. (1960): Das weiße Blutbild des gesunden  
und an infektiöser Bauchwassersucht erkrankten  
Karpfens.  
Dissertation Universität München
- 47) LIEBMANN, H., K. OFFHAUS und S. RIEDMÜLLER (1960):  
Elektrophoretische Blutuntersuchungen bei normalen  
und bauchwassersuchtkranken Karpfen.  
Schweiz.Z.Hydrol. 12, 507-517

- 48) MAC EWEN, J.D. and R.P. GECKLER (1968): Comparative studies of 90-day continuous exposure to  $O_3$ ,  $NO_2$  and  $CCl_4$  at reduced and ambient pressures. Aerospace Medical Research Laboratories Report AMRL - TR, 67-68
- 49) MITTLER, S., M. KING and B. BURKHARDT (1957): Toxicity of Ozone. III: Chronic Toxicity. A.M.A.Arch.Ind.Health 15, 191-197
- 50) MOLNAR, Gy. und E. TAMASSY (1970): Study of the Haemoglobin Content of a single Erythrocyte (Mindex) in various cultured fish species. J.of Fish Biology 2, 167-172
- 51) MÜNNICH, H. (1958): Zusammenhänge zwischen dem Sauerstoffgehalt des Wassers und dem Blutzuckerspiegel des Karpfens. Z.f.Fischerei N.F. 6, 447-458
- 52) NASH, T. (1967): Photometrische Bestimmung von Ozon mit Diacetyldihydrolutidin. Z.Atmospheric Environment 1, 679-687
- 53) PAWLOW und KROLIK (1936): Untersuchungen zur Physiologie des Blutes. Zit.in: SCHÄPERCLAUS, W. (1954): Fischkrankheiten. 2.Aufl., Akademie-Verlag, Berlin
- 54) PLEHN, M. (1915): Zur Kenntnis der Salmonidenleber im gesunden und kranken Zustand. Zeitschr.f.Fischerei 17, 1-24
- 55) REICHENBACH-KLINKE, H.-H. (1966): Krankheiten und Schädigungen der Fische. Fischer-Verlag, Stuttgart
- 56) REICHENBACH-KLINKE, H.-H., F. BRAUN, H. HELD und S. RIEDMÜLLER (1968): Vorläufige Ergebnisse vergleichend-physiologischer Untersuchungen an Coregonen verschiedener oberbayerischer Seen (Fettgehalt, Blutbild, Fermentspiegel, Parasitierung). Arch.Fischereiwiss. XIX, 114-130
- 57) REICHENBACH-KLINKE, H.-H. (1970): Methodik der Fischuntersuchung im Hinblick auf die Wirkung von Abwassergiften. Münch.Beitr.z.Abwasser-, Fischerei- u.Flußbiologie 19, 60-68

- 58) RIEDMÜLLER, S. (1965): Elektrophoretische Bluteiweiß-  
untersuchungen bei gesunden und kranken Karpfen.  
(Festschrift) Allgem.Fischerei-Zeitung 18, 28-35
- 59) RIGGERT, F. (1922): Beiträge zur Anatomie der Fisch-  
leber mit besonderer Berücksichtigung der Leber  
der Bachforelle (*Trutta fario*) und der Regenbogen-  
forelle (*Trutta iridea*).  
Dissertation Universität Hannover
- 60) ROBL, R. (1970): Untersuchungen über die Auswirkungen  
des Ligula-Befalls auf die Blutzusammensetzung  
beim Brachsen.  
Dissertation Universität München
- 61) ROMEIS, B. (1968): Mikroskopische Technik.  
15.Aufl. Verlag R.Oldenbourg, München
- 62) SACHSENMAIER, W. (1960): Einwirkungen von Ozon auf  
lebende Zellen und Nukleinsäuren.  
Mitt.Angew.Chemie 72, 578
- 63) SCHALM, O.W. (1961): Veterinary Hematology.  
Lea and Febiger, Philadelphia, Pennsylvania
- 64) SCHÄPERCLAUS, W. (1954): Fischkrankheiten.  
2.Aufl., Akademie-Verlag, Berlin
- 65) SCHLICHER, J. (1927): Vergleichend-physiologische  
Untersuchungen der Blutkörperchenzahlen bei  
Knochenfischen.  
Zool.Jb.Abt.Phys. 43, 121-200
- 66) SCHMID, J. (1957): Wird auch die Bachforelle von der  
"neuen" Forellenkrankheit befallen?  
Allgem.Fisch.-Ztg. 82, 123
- 67) SCHMIDT, R. (1966): Messung der Leistungskurve eines  
Ozonisators.  
O<sub>3</sub> Information International 4  
Firma Sander, Eltze
- 68) SHAW, A.F. (1930): A direct method for counting the  
leucocytes, thrombocytes and erythrocytes of  
birds blood.  
J.Pathn.and Bact. 23, 333-335

- 69) SIMPSON, W.W. (1926): The effects of asphyxia and isletectomy on the Bloodsugar of *Myoxocephalus* and *Ameiurus*.  
The Am.Journ.of Physiol. 77, 409
- 70) SNIESZKO, S.F. (1961): Microhematocrit values in rainbow trout, brown trout and brook trout.  
Prog.Fish-Cult. 23, 114-119
- 71) SORWATSCHEW, K.F. (1957a): Veränderung des Eiweißgehaltes im Blutserum des Karpfens während der Überwinterung.  
Biochemie 22, 872-878
- 72) SORWATSCHEW, K.F. (1957b): Elektrophoretische Untersuchungen der Eiweißfraktionen des Blutserums von Karpfen, die unter unterschiedlichen Bedingungen aufgezogen wurden.  
Zool.Journ. 36, 737-741
- 73) STEFFENS, W. (1955): Der Einfluß von Umweltfaktoren auf die Höhe des Hämoglobingehaltes und die Erythrozytenzahl.  
Z.f.Fischerei N.F. 4, 161-188
- 74) STEFFENS, W. (1962): Zur Methodik der Hämoglobinbestimmung bei Fischen.  
Die Naturwissenschaften 49, 109-110
- 75) STOKINGER, H.E. (1957): Evaluation of the hazards of ozone and oxides of nitrogen, factors modifying toxicity.  
A.M.A.Arch.Ind.Health 15, 181-190
- 76) STOKINGER, H.E., W.D. WAGNER and O.J. DOBROGORSKI (1957): Ozone toxicity studies.  
A.M.A.Arch.Ind.Health 16, 514-522
- 77) STOKINGER, H.E. (1965): Ozone Toxicology. A review of research and industrial experience.  
A.M.A.Arch.Envirnm.Health 10, 719-731
- 78) STUMM, W. (1954): Der Zerfall von Ozon in wässriger Lösung.  
Helv.chim.Acta 37, 773-778
- 79) STUMM, W. (1956): Einige chemische Gesichtspunkte zur Wasserozonisierung.  
Schweiz.Z.Hydrol. 18, 201-207

- 80) SULZER, F. (1958): Über das Verhalten wässriger Ozonlösungen.  
Schweiz.Z.Hydrol. 20, 16-29
- 81) SUWOROW, J.K. (1959): Allgemeine Fischkunde.  
2.Aufl., VEB-Verlag der Wissenschaften, Berlin
- 82) TOPF, W. (1953): Über die Blutbildung und Blutbildungsorgane beim Karpfen.  
Vorläuf.Mitt.Zool.Anz. 150, 91-104
- 83) TOPF, W. (1955): Die Blutbildung und die Blutbildungsstätten beim Karpfen.  
Z.Fischerei N.F. 4, 257-287
- 84) THRUSTON, R.U. (1967): Electrophoretic patterns of bloodserum proteins from rainbow trout (*Salmo gairdneri*).  
J.Fish.Res.Bd.Canada 24, 2169-2188
- 85) WAGNEROVA, D.M., K. ECKSCHLAGER und J. VEPREK-SISKA (1967): Ozonbestimmung in wässrigen Lösungen.  
Collection Czechoslov.Chem.Comm. 32, 4032-4042
- 86) WEDEMEYER, G. (1969): Stress of Anesthesia with M.S.222 and Benzocaine in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*).  
J.Fish.Res.Bd.Canada 27, 909-914
- 87) WHITE, F.D. (1928): Reducing substances in the blood of the Dogfish *Squalus sucklii* and certain other fishes.  
Journ.of Biolog.Chem. 77, 655
- 88) WURHMANN, K. und H. WOKER (1949): Experimentelle Untersuchungen über die Ammoniak- und Blausäure-Vergiftung.  
Revue Suisse d'Hydrologie XI
- 89) WURHMANN, F. und Ch. WUNDERLY (1952): Die Bluteiweißkörper des Menschen.  
B.Schwabe und Co., Basel
- 90) WURHMANN, K. und J. MEYRATH (1955): Über die bakterizide Wirkung wässriger Ozonlösungen.  
Schweiz.Z.Path.Bakt. 18, 1060-1069

- 91) WUNDER, W. (1936): Physiologie der Süßwasserfische  
Mitteleuropas.  
Sonderabdruck aus dem Handbuch der Binnenfischerei  
Mitteleuropas, Band II B; E. Schweizerbartsche  
Verlagsbuchhandlung, Stuttgart
- 92) ZEHENDER, F. und W. STUMM (1953): Die Ozonbestimmung  
bei der Trinkwasseruntersuchung.  
Mitt.Lebensm.Hyg. 44, 206-213

## Lebenslauf

Am 3. Dezember 1942 wurde ich als Sohn des Beamten Ernst Ollenschläger und seiner Ehefrau Ella geb. Friemann in Schwerin/Mecklenburg geboren.

Nach acht Jahren Volksschule ging ich ab 1957 für weitere vier Jahre zur Oberschule in Schwerin und bestand im Jahre 1961 die Reifeprüfung. Nach Ableistung eines praktischen Jahres im Fischkombinat Saßnitz/Rügen immatrikulierte ich mich an der Humboldt-Universität in Berlin für das Fach Fischereibiologie.

Von Oktober 1962 bis Juli 1963 besuchte ich das Gymnasium in Gummersbach/Nordrhein-Westfalen und bestand hier die Ergänzungsprüfung für DDR-Abiturienten.

Im Wintersemester 1963 immatrikulierte ich mich an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München und legte nach einem neunsemestrigen Studium im Jahre 1968 das Staatsexamen ab.

Seit 1969 arbeite ich an einem von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanzierten Forschungsvorhaben im Zoologisch-Parasitologischen Institut der Tierärztlichen Fakultät der Universität München.



The first part of the report  
 is a general statement of the  
 purpose and scope of the study.  
 It is followed by a description of the  
 methods used in the study.  
 The results of the study are then  
 presented in a series of tables and  
 figures. The final part of the report  
 is a discussion of the results and  
 their implications.

The second part of the report  
 is a detailed description of the  
 methods used in the study.  
 This includes a description of the  
 subjects, the materials, and the  
 procedures used in the study.  
 The third part of the report  
 is a presentation of the results  
 of the study. This is done in the  
 form of a series of tables and  
 figures. The final part of the  
 report is a discussion of the  
 results and their implications.



